

---

**Relevanz der Galenik am Beispiel des Critical Dose Pharmakons Ciclosporin:  
Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik  
verschiedener galenischer Formulierungen  
an gesunden Probanden und Ratten**

---



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Apotheker Stephan Ladenburger  
aus Ingolstadt

2003

---

---

## **Promotionsgesuch**

Eingereicht am: 10. Juni 2003

Erster Berichterstatter: PD Dr. med. Lothar Färber

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Frieder Kees

Mündliche Prüfung: 04. Juli 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn PD Dr. med. Lothar Färber

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. rer. nat. Sigurd Elz

PD Dr. med. Lothar Färber

Prof. Dr. rer. nat. Frieder Kees

Prof. Dr. rer. nat. Achim Göpferich

---

---

*Im Gedenken an meinen Großvater Heinrich*

---

---

Die Dissertation entstand unter Anleitung von Herrn PD Dr. Lothar Färber in der Zeit von Juli 2001 bis Juni 2003 am Lehrstuhl für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Regensburg.

In erster Linie möchte ich meinem akademischen Lehrer

Herrn PD Dr. Lothar Färber

für die Möglichkeit danken, unter seiner Betreuung ein Promotionsverfahren zu einer interessanten Thematik anstreben zu können. Seine intensive und überaus kompetente Betreuung, die engagierte Bereitschaft zur Diskussion der erhaltenen Ergebnisse und die hervorragenden wissenschaftlichen Anregungen waren maßgebend für das zügige Voranschreiten der nun vorliegenden Arbeit.

Danken möchte ich des weiteren

Herrn Prof. Dr. Frieder Kees für die intensive, fundierte Einführung in die HPLC-Analytik, die, von praktischer Erfahrung geprägte Unterstützung bei der Vorbereitung von Versuchen und die unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion der erhaltenen Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. Horst F. Grobecker für das Überlassen eines Arbeitsplatzes an seinem Lehrstuhl und seine zahlreichen Anregungen zu Versuchsprojekten.

Herrn Dr. Klaus Höcherl und Herrn Dr. Jens Köhler für zahlreiche praktische Ratschläge, insbesondere während der Vorbereitung von Versuchen.

Herrn Dr. Michael Bucher für seine praktische Anleitung in operativen Techniken im Rahmen der Tierversuche.

Herrn Dr. Sieghard Hinderer für die rücksichtsvolle und offene Bereitschaft, mein wissenschaftliches Arbeiten zu unterstützen.

Frau Regina Menrath, Frau Gertraud Wilberg und Frau Katharina Wohlfart für die Mithilfe in der Analytik und bei der Zubereitung eines FDA-konformen Probandenfrühstücks.

Meinen Kolleginnen Frau Dr. Franziska Dreher und Frau Kristina Lotter, wie auch Frau Rita Prenzyna für die freundliche Zusammenarbeit am Lehrstuhl.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung, sowie Tina für ihr hohes Maß an Toleranz und Geduld.

---

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1	ALLGEMEINE IMMUNOLOGIE .....	5
1.1.1	T-Lymphozyten .....	5
1.1.2	B-Lymphozyten .....	7
1.2	TRANSPLANTATIONSIMMUNOLOGIE .....	8
1.3	CICLOSPORIN .....	10
1.3.1	Chemische Eigenschaften .....	10
1.3.2	Pharmakodynamik .....	10
1.3.3	Unerwünschte Wirkungen .....	12
1.3.4	Pharmakokinetik .....	13
1.3.5	Wechselwirkungen von Ciclosporin mit anderen Substanzen .....	16
1.3.6	Galenik ciclosporinhaltiger Formulierungen .....	17
1.3.7	Therapeutic Drug Monitoring (TDM) .....	18
1.3.8	Bioäquivalenz ciclosporinhaltiger Formulierungen .....	20
1.3.9	Einfluss von Ciclosporin auf ausgewählte gefäßtonisierende Mediatoren .....	22
1.4	REPERTOIRE IMMUNSUPPRESSIVER PHARMAKA .....	24
1.4.1	Tacrolimus (FK 506, Prograf®) .....	24
1.4.2	Glucocorticoide .....	24
1.4.3	Azathioprin (Imurek®) .....	25
1.4.4	Mycophenolsäure .....	25
1.4.5	Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®) und Everolimus (SDZ-RAD) .....	26
1.4.6	Weitere Immunsuppressiva .....	27
1.5	NEUE WEGE IN DER IMMUNSUPPRESSION .....	27
<b>2.</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>PROBANDEN, MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
3.1	CHEMIKALIEN .....	30
3.2	PHARMAKA .....	30
3.3	GERÄTE UND INSTRUMENTE .....	31
3.4	VERSUCHSTIERE .....	32
3.5	TIERHALTUNG .....	32
3.6	IN VITRO UNTERSUCHUNG ZUR RESORPTION VON CICLOSPORIN AM ISOLIERTEN RATTENILEUM .....	32
3.6.1	Versuchsziel .....	32
3.6.2	Testpräparate .....	32
3.6.3	Organbad .....	33
3.6.4	Isolierung des Ileums .....	33
3.7	ADSORPTION VON CICLOSPORIN AUS GELÖSTEN KAPSELN AN GLASOBERFLÄCHEN .....	34
3.7.1	Versuchsziel .....	34
3.7.2	Testpräparate .....	34
3.7.3	Versuchsdurchführung .....	34
3.8	ADSORPTION VON CICLOSPORIN AUS CICLOSPORIN-LÖSUNGEN AN GLASOBERFLÄCHEN .....	34
3.8.1	Versuchsziel .....	34
3.8.2	Testpräparate .....	34
3.8.3	Versuchsdurchführung .....	35

---

3.9	UNTERSUCHUNG DER BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS, IN WASSER BZW. OLIVENÖL GELÖSTEN CYCLOSPORINE CAPSULES (EONLABS) UND SANDIMMUN® OPTORAL KAPSELN (NOVARTIS) BEI RATTEN UNTER STEADY-STATE BEDINGUNGEN .....	35
3.9.1	Vorversuch: Bestimmung des Zeitraums bis zum Erreichen von steady-state Bedingungen .....	35
3.9.2	Hauptversuch: Zielsetzung .....	36
3.9.3	Durchführung .....	36
3.9.4	Kurzkinetik .....	36
3.9.5	Pharmakokinetische Berechnung .....	37
3.10	UNTERSUCHUNG ZUR BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS CICLORAL® BEI GESUNDEN PROBANDEN – EINNAHME NACH FETTREICHEM FRÜHSTÜCK VS. NÜCHTERNAPPLIKATION .....	37
3.10.1	Studienziel .....	37
3.10.2	Studienplan .....	38
3.10.3	Probandenpopulation .....	38
3.10.4	Medikation .....	39
3.10.5	Durchführung der Studie .....	39
3.10.6	Blut- und Urinproben .....	41
3.10.7	Datenmanagement .....	41
3.11	PILOTSTUDIE: UNTERSUCHUNG ZUR BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS CYCLOSPORINE CAPSULES (EONLABS) VS. CICLORAL® (HEXAL) AN GESUNDEN PROBANDEN .....	42
3.11.1	Studienziel .....	42
3.11.2	Studienplan und Probanden .....	42
3.11.3	Medikation .....	42
3.11.4	Durchführung der Studie .....	43
3.11.5	Datenmanagement .....	43
3.12	ANALYSE VON CICLOSPORIN UND CICLOSPORIN-METABOLITEN IN VERSCHIEDENEN ORGANISCHEN MATRICES .....	43
3.12.1	Probenvorbereitung .....	44
3.12.2	Chromatographisches System .....	45
3.12.3	Auswertung .....	46
3.12.4	Beispielchromatogramme .....	47
3.13	ANALYSE VON CORTISOL UND CORTISON IM PLASMA .....	48
3.13.1	Probenvorbereitung .....	48
3.13.2	Chromatographisches System .....	49
3.13.3	Beispielchromatogramme .....	50
3.13.4	Auswertung .....	51
3.14	ANALYSE VON PROSTACYCLIN IM URIN .....	51
3.14.1	Durchführung .....	51
3.14.2	Auswertung .....	52
3.15	ANALYSE VON THROMBOXAN A <sub>2</sub> IM URIN .....	52
3.16	ANALYSE VON STICKSTOFFMONOXID (NO) IM URIN (CIC-BV-1) .....	53
3.17	BESTIMMUNG DES KREATININS IN PLASMA UND URIN .....	54
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
4.1	IN VITRO UNTERSUCHUNG ZUR RESORPTION VON CICLOSPORIN AM ISOLIERTEN RATTENILEUM .....	55
4.2	ADSORPTION VON CICLOSPORIN AUS GELÖSTEN KAPSELN AN GLASOBERFLÄCHEN .....	56
4.3	ADSORPTION VON CICLOSPORIN AUS CICLOSPORIN-LÖSUNGEN AN GLASOBERFLÄCHEN .....	57

---

4.4	UNTERSUCHUNG ZUR BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS, IN WASSER BZW. OLIVENÖL GELÖSTEN CYCLOSPORINE CAPSULES (EONLABS) UND SANDIMMUN® OPTORAL KAPSELN (NOVARTIS) BEI RATTEN UNTER STEADY-STATE BEDINGUNGEN .....	58
4.4.1	Bestimmung des Zeitraums bis zum Erreichen von steady-state Bedingungen.....	58
4.4.2	Bioverfügbarkeit von Ciclosporin.....	59
4.4.3	Metabolisierung von Ciclosporin.....	61
4.5	UNTERSUCHUNG ZUR BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS CICLORAL® BEI GESUNDEN PROBANDEN – EINNAHME NACH FETTREICHEM FRÜHSTÜCK VS. NÜCHTERNAPPLIKATION .....	62
4.5.1	Probandenpopulation.....	62
4.5.2	Anamnese.....	63
4.5.3	Laborbefund .....	63
4.5.4	Vormedikation.....	63
4.5.5	Protokolleinhaltung .....	63
4.5.6	Randomisierung und Behandlung .....	63
4.5.7	Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cicloral® Kapseln.....	64
4.5.8	Metabolisierung von Ciclosporin.....	67
4.5.9	Plasmaspiegel von Cortisol und Cortison .....	71
4.5.10	Urinkonzentrationen der Prostanoid Thromboxan-B <sub>2</sub> (TxB <sub>2</sub> ) und 6-keto PGF <sub>1α</sub> ...	72
4.5.11	Urinkonzentrationen von Nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) und Nitrat (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	73
4.5.12	Kreatininkonzentrationen in Plasma und Urin .....	74
4.5.13	Verträglichkeit.....	74
4.5.14	Begleitmedikation .....	75
4.5.15	Interkurrente Erkrankungen .....	75
4.5.16	Abschlussuntersuchung.....	75
4.6	PILOTSTUDIE: UNTERSUCHUNG ZUR BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS CYCLOSPORINE CAPSULES (EONLABS) VS. CICLORAL® (HEXAL) AN GESUNDEN PROBANDEN .....	75
4.6.1	Probandenpopulation.....	75
4.6.2	Vormedikation und Begleitmedikation .....	75
4.6.3	Randomisierung und Behandlung .....	76
4.6.4	Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cyclosporine Capsules (EON) und Cicloral® Kapseln (CIC).....	76
4.6.5	Metabolisierung von Ciclosporin.....	77
4.6.6	Plasmaspiegel von Cortisol und Cortison .....	78
4.6.7	Einfluss von Ciclosporin auf Blutdruck und Herzfrequenz .....	79
4.6.8	Verträglichkeit.....	79
5.	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
5.1	IN VITRO UNTERSUCHUNG ZUR RESORPTION VON CICLOSPORIN AM ISOLIERTEN RATTENILEUM.....	80
5.2	ADSORPTION VON CICLOSPORIN AN GLASOBERFLÄCHEN .....	81
5.3	UNTERSUCHUNG ZUR BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS, IN WASSER BZW. OLIVENÖL GELÖSTEN CYCLOSPORINE CAPSULES (EONLABS) UND SANDIMMUN® OPTORAL KAPSELN (NOVARTIS) BEI RATTEN UNTER STEADY-STATE BEDINGUNGEN .....	82
5.3.1	Bioverfügbarkeit von Ciclosporin.....	82
5.3.2	Metabolisierung und Gewebsverteilung von Ciclosporin.....	83
5.4	PILOTSTUDIE: UNTERSUCHUNG ZUR BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS CYCLOSPORINE CAPSULES (EONLABS) VS. CICLORAL® (HEXAL) AN GESUNDEN PROBANDEN .....	84

---

5.4.1	Bioverfügbarkeit von Ciclosporin.....	84
5.4.2	Einfluss von Ciclosporin auf Cortisol- und Cortisonspiegel.....	85
5.5	UNTERSUCHUNG ZUR BIOVERFÜGBARKEIT VON CICLOSPORIN AUS CICLORAL <sup>®</sup> BEI GESUNDEN PROBANDEN – EINNAHME NACH FETTREICHEM FRÜHSTÜCK VS. NÜCHTERNAPPLIKATION .....	85
5.5.1	Bioverfügbarkeit von Ciclosporin.....	86
5.5.2	Korrelation zwischen Ciclosporin-Spiegeln und der AUC <sub>0-4h</sub> .....	87
5.5.3	Metabolisierung von Ciclosporin .....	88
5.5.4	Einfluss von Ciclosporin im Test- und Referenzschema auf die Plasmaspiegel von Cortisol und Cortison.....	89
5.5.5	Einfluss von Ciclosporin im Test- und Referenzschema auf vasodilatatorische und – konstriktorische Mediatoren .....	90
6.	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
7.	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>92</b>
8.	<b>LITERATUR.....</b>	<b>93</b>



## 1. Einleitung

Vor über 100 Jahren, im März 1902, gelang dem Wiener Chirurgen Emerich Ullmann die erste vorübergehend erfolgreiche Nierentransplantation bei einem Hund. Das eingesetzte Organ funktionierte und produzierte für immerhin fünf Tage Urin. In den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts folgten dann Berichte von Joseph Murray über erste erfolgreiche Transplantationen an Menschen, zunächst an eineiigen Zwillingen, später auch an genetisch nicht identischen Brüdern. Der Erfolg dieser Pioniertaten war jedoch von sehr kurzer Dauer, da man der Immunantwort des Organismus auf das fremde Organ nicht adäquat begegnen konnte. Mit dem Immunsuppressivum Azathioprin stand erstmals ein effektives Pharmakon zur Bekämpfung der Abstoßung eines Transplantats zur Verfügung. Eine neue Ära in der Entwicklung der Transplantationsmedizin begann mit der Entnahme von Bodenproben in der Hardanger Vidda im Süden Norwegens. In diesen Proben wuchs der Pilz *Tolypocladium inflatum* Gams aus der Gruppe der Fungi imperfecti. Aus diesem Pilz wurde 1971 Ciclosporin isoliert, das in Versuchen an Mäusen schnell eine immunsuppressive Wirkung offenbarte. Mit der Markteinführung von Ciclosporin im Jahr 1983 war erstmalig eine potente und relativ spezifische, nicht zytotoxische Immunsuppression möglich, die zu einer deutlichen Verbesserung des Therapieresultats führte. Die Entwicklung weiterer sehr wirksamer Pharmaka wie auch das stetig wachsende Wissen über die, bei Organabstoßungen ablaufenden immunologischen Prozesse, verhalfen der Transplantationsmedizin zu ihrem heutigen Erfolg.

### 1.1 Allgemeine Immunologie

Das Immunsystem agiert als komplexes, fein aufeinander abgestimmtes Zusammenwirken zahlreicher Faktoren zum Schutz des menschlichen Organismus. Grundsätzlich lassen sich die unspezifische, angeborene und die spezifische, adaptive Immunantwort unterscheiden. Erstere wird vorwiegend von Granulozyten, zirkulierenden Monozyten, organspezifischen Makrophagen (Kupfferzellen, Langerhans-Zellen) und dem Komplementsystem unterhalten. Diese erkennen allgemeine Strukturen, die vielen pathogenen Mikroorganismen gemeinsam sind und fungieren somit als erstes Schutzschild im Körper. Die spezifische Immunantwort dient der Bekämpfung von Pathogenen, die durch das unspezifische System nicht beseitigt werden konnten. Tragende Säulen sind hier T- und B- Lymphozyten.

#### 1.1.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten (T-Zellen) entwickeln sich aus Knochenmarkstammzellen. Die Reifung erfolgt dagegen im Thymus. Dort wird durch Selektionierung in einer Reihe von Prozessen (u.a. klonale Deletion) die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Strukturen gewährleistet. T-Zellen, die keine Reaktivität gegen Antigene aufweisen oder denen die Eigenschaft der Selbsttoleranz fehlt werden durch programmierten Zelltod (Apoptose) beseitigt.

T-Lymphozyten besitzen auf ihrer Oberfläche bis zu 30.000 T-Zell-Rezeptoren (TZR), mit deren Hilfe Antigene erkannt und spezifisch gebunden werden können. Der Rezeptor ist heterodimer und besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Polypeptidkette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Beide Ketten haben eine konstante und eine variable Region, letztere stellt die Bindungsstelle für Antigene dar. Dem TZR unmittelbar benachbart ist eine Gruppe von fünf membranständigen Peptidketten, dem so genannten CD3. Bindet der TZR an ein Antigen, so

ändert sich die Konformation des CD3, und die Signaltransduktion in der T-Zelle wird aktiviert (siehe unten).

T-Zellen können, im Gegensatz zu B-Lymphozyten, keine freien Antigene binden. Für die Stimulierung ist eine entsprechende Antigenpräsentation erforderlich, bei der das Antigen an spezielle Proteine auf der Oberfläche von *Antigen-präsentierenden Zellen* (APZ) gebunden ist. Diese Proteine spielen auch bei der Abstoßung fremden Gewebes eine zentrale Rolle. Aus diesem Grund wurde die Gruppe von Genen, die für diese Proteine codiert, *major histocompatibility complex* (MHC) benannt. MHC findet sich bei allen Wirbeltieren und ist beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert (Katznelson et al. 2001). Die für die Präsentation von Antigenen relevanten Proteine unterscheidet man in MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Moleküle. Erstere sind auf allen kernhaltigen Zellen lokalisiert, wenngleich in stark variierenden Konzentrationen. MHC-II-Moleküle sind restriktiver verteilt und finden sich vor allem auf B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen.

Da vollständige Proteinantigene für ein Andocken an die Bindungsstelle der MHC-Moleküle zu groß wären, werden sie in den APZ zu Peptidfragmenten abgebaut und zusammen mit dem MHC-Molekül auf der Zelloberfläche exprimiert. Dieser Antigen-MHC-Komplex wird vom T-Zell-Rezeptor erkannt und gebunden. Zusätzlich kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Corezeptoren auf der T-Zelle und dem MHC-Molekül. Nach der Art dieser Corezeptoren werden reife T-Lymphozyten wie folgt unterteilt:

- CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (T-Helfer-Zellen) und
- CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen).

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen binden dabei an MHC-II und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an MHC-I-Moleküle (Bjorkman et al. 1987, Brown et al. 1988). Für die Aktivierung von naiven T-Zellen sind neben der Bindung von TZR und CD4 / CD8 an MHC (erstes Signal) noch zahlreiche Interaktionen von costimulierenden Faktoren erforderlich (zweites Signal). Auf der Oberfläche der T-Zellen sind das unter anderem Vertreter der Integrin-Superfamilie, z.B. CD28 und lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). Diese binden an ihr jeweiliges Pendant B7 bzw. intercellular-adhesion-molecule-1 oder -2 (ICAM-1, -2) auf der APZ. Die Interaktion von CTLA4 (T-Zelle), welches dem CD28 strukturell sehr ähnlich ist, mit B7 hat einen hemmenden Effekt auf T-Zellen und trägt vermutlich zur Vermeidung überschießender Immunreaktionen bei (siehe Abb. 1). Die Wechselwirkung von CD40 auf der APZ mit dem CD40-Ligand auf der T-Zelle induziert die Expression von B7 und wirkt somit costimulatorisch (Sayegh 1999). Bei Fehlen des zweiten Signals treten die T-Zellen in das Stadium der klonalen Anergie ein, in dem sie auf weitere Stimulation nicht mehr reagieren (Sayegh und Turka 1998, Gudmundsdottir und Turka 1999).

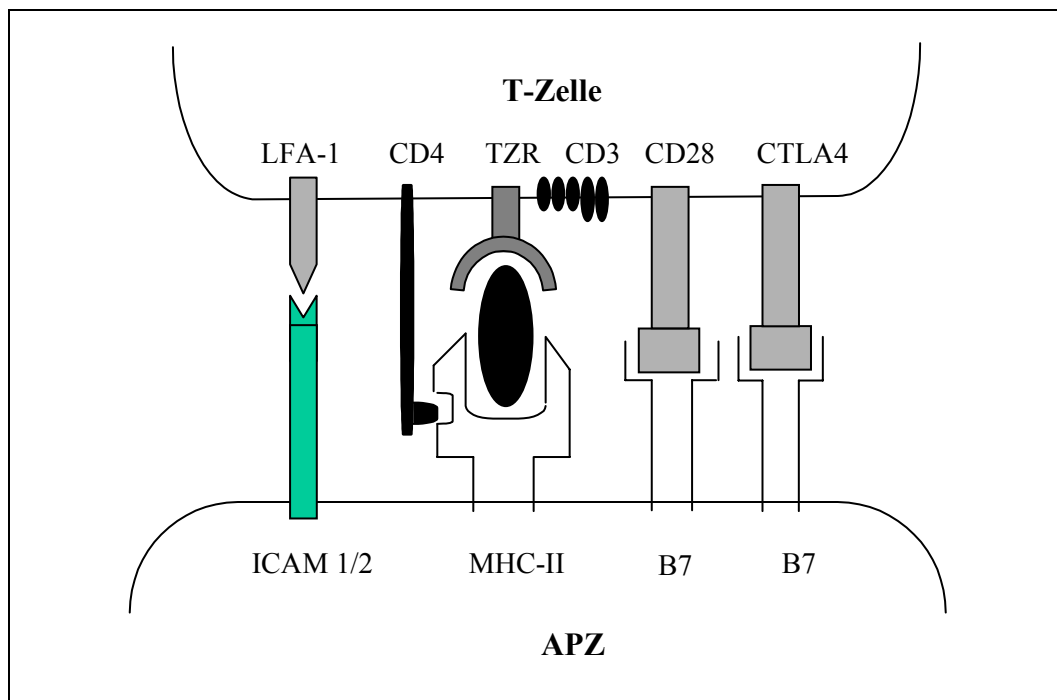


Abbildung 1: Bindung eines T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes an den MHC-II/Antigen-Komplex auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) unter Beteiligung costimulierender Faktoren.

Durch erstes und zweites Signal aktivierte T-Zellen synthetisieren und sezernieren *Interleukin-2* (IL-2) und exprimieren gleichzeitig einen hochaffinen IL-2-Rezeptor. Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor (drittes Signal) stellt einen starken Stimulus zur Teilung der T-Zelle dar. Daraus resultieren innerhalb kurzer Zeit große Mengen an T-Zellen mit identischem TZR (klonale Expansion). Nach einer Phase von wenigen Tagen differenzieren sich die T-Zellen zu T-Effektorzellen. Das sind zum einen Zytotoxine bildende CD8<sup>+</sup>-Effektorzellen. Diese sezernieren porenbildende Perforine sowie Granzyme, die durch diese Poren in die Zielzelle gelangen und dort Apoptose einleiten. Zum anderen handelt es sich um zytokinproduzierende CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen, die abhängig von den synthetisierten Zytokinen in Th-0 bis Th-3 eingeteilt werden. Die meisten Pathogene lösen eine Th-1-Immunantwort aus. Die resultierende Sezernierung von IL-2 und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) führt zur Aktivierung von Makrophagen, der Bildung zytotoxischer T-Zellen und ist in die Antikörperproduktion von B-Zellen involviert.

### 1.1.2 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten entwickeln sich in der fetalen Leber und nach der Geburt im Knochenmark (bone marrow). Im Gegensatz zu T-Zellen sind B-Lymphozyten auch durch freie, nicht an MHC gebundene Antigene aktivierbar. Die Antigenerkennung erfolgt nicht über den TZR sondern über *Immunglobuline* (Ig) auf der Zelloberfläche. Bindet ein Antigen an den spezifischen Ig-Rezeptor, so wird es in das Zellinnere transportiert. Dort wird es zu Peptidfragmenten abgebaut (prozessiert) und, an ein MHC-II-Molekül gebunden, exprimiert. Die Präsentation des MHC-II/Antigen-Komplexes führt zur Interaktion mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (gekoppelte Erkennung). Für die Aktivierung der B-Zelle ist dabei die Bindung von CD40 mit dem CD40 Ligand auf der T-Zelle von Bedeutung, die zur klonalen Expansion der B-Zelle führt. Im weiteren Verlauf erfolgt die Differenzierung zu einer *Antikörper* (AK) sezernierenden Plasmazelle. Dabei produziert jede Zelle Immunglobuline einer eigenen Spezifität. Die ins Blut abgegebenen Antikörper sind Teil

der humoralen Abwehr und führen u.a. zur Opsonierung von Pathogenen und zur Aktivierung des Komplementsystems, von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten.

Neben dieser T-Zell-abhängigen Aktivierung existieren aber auch T-Zell unabhängige Antigene (Lipopolysaccharide, Glykoproteine). Sie können B-Zellen ohne Beteiligung von T-Zellen aktivieren (Neumayer 2001).

## 1.2 Transplantationsimmunologie

Das Langzeitüberleben eines Transplantats hängt von zahlreichen präoperativen Risikofaktoren ab. Hierzu zählen vor allem ein hohes Spenderalter, eine lange Ischämiezeit, langjährige Dialyse und Hypertonie des Empfängers sowie Infektionen mit Cytomegalievirus (CMV) oder Hepatitis B und Hepatitis C Viren. Der Therapieerfolg wird auch von der ethnischen Zugehörigkeit beeinflusst. Afroamerikaner scheinen gegenüber kaukasischen Patienten ein niedrigeres Transplantatüberleben aufzuweisen, während dieses nach 5 Jahren bei Asiaten um ca. 10 % höher liegt als bei Weißen (Katznelson et al. 2001). Einen weiteren wichtigen Risikofaktor stellt eine hohe Zahl an HLA-Mismatches (MM) dar (Kasiske 1997, Opelz et al. 1998). Die *humanen Leukozytenantigene* (HLA) sind polymorphe Moleküle auf der Zelloberfläche, für die der MHC codiert. Bei der Zuteilung von Spenderorganen stellt eine möglichst vollständige Übereinstimmung des HLA-Musters von Spender und Empfänger ein Hauptkriterium für die Auswahl dar (Burdick 2001).

Postoperative Risikofaktoren für einen Transplantatverlust sind neben einer verzögerten Funktionsaufnahme des transplantierten Organs vor allem akute und chronische Abstoßungen (Häyry 1994). Die Abstoßung aufgrund von HLA-Unterschieden (mismatches) verläuft ähnlich wie die Immunantwort auf normale Umweltantigene (Bakterien, Viren), jedoch in extrem verstärktem Ausmaß (Krensky 1997). Eine Ursache für die starke Abstoßung ist die Fähigkeit einzelner T-Zellen, allogenenes MHC auf Zellen des Transplantats zu erkennen und darauf zu reagieren. Normalerweise erkennen T-Zellen nur eigenes MHC in Verbindung mit Antigenfragmenten, wie sie von APZ exprimiert werden (siehe oben). Der genaue Grund, der es T-Zellen erlaubt, allogenenes MHC mit oder ohne gebundenem Peptid direkt zu erkennen und zu binden ist noch nicht bekannt. Dieser sogenannte *direkte Weg* der Alloantigen-Erkennung spielt in der frühen akuten Transplantatabstoßung eine entscheidende Rolle (Helderman und Goral 2001). Beim *indirekten Weg* werden Alloantigene von APZ des Empfängers prozessiert und anschließend den T-Zellen präsentiert. Diese Antigene können Spender-MHC sein, der sich vom Parenchym des Transplantats abgelöst hat oder aber von phagozytierenden Zellen aufgenommen wurde. In beiden Fällen wird das Antigen nach Prozessierung zusammen mit Eigen-MHC-Klasse-II präsentiert. CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen initiieren nach Bindung an den MHC-II-Antigen-Komplex die für Abstoßungen typische Immunantwort und sind somit für die Aufrechterhaltung einer Abstoßung verantwortlich (Helderman und Goral 2001).

Wie unter Punkt 1.1.1 geschildert, ist zusätzlich zur Bindung des TZR an MHC eine Costimulierung erforderlich. Erst nach dem Zusammenwirken von erstem und zweitem Signal erfolgt die Aktivierung der T-Zelle, die mit der Produktion von Zytokinen verbunden ist. Für die Abstoßungsreaktion sind vor allem IL-2 und IFN- $\gamma$  relevant. IL-2 ist für die Aktivierung von T-Zellen nötig (drittes Signal), während IFN- $\gamma$  die Aktivität von APZ erhöht und Makrophagen aktiviert, die ihrerseits Gewebsentzündungen auslösen (Lechler et al. 1990). Darüber hinaus induziert IFN- $\gamma$  die Expression von MHC-II-Molekülen auf Gefäßendothel- und Parenchymzellen. Die dadurch vergrößerte Anzahl an T-Zell-Stimuli im Transplantat forciert die Abstoßung (Neumayer 2001).

Abstoßungsreaktionen werden anhand des Zeitpunkts des Auftretens nach Transplantation und nach klinischen und histologischen Kriterien in hyperakute, akute und chronische Abstoßungen eingeteilt. Die pathologische Unterscheidung erfolgt mit Hilfe der Banff-Klassifikation (Racusen et al. 1999).

*Hyperakute Abstoßungen* ereignen sich innerhalb von Minuten bis wenige Stunden nach Reperfusion des Transplantats und werden durch präformierte anti-HLA-Klasse I (IgG) oder anti-ABO-Antikörper ausgelöst. Die Antikörper binden an Endothelzellen in den Gefäßen des Transplantats, aktivieren das Komplementsystem und führen letztlich zur Gefäßthrombose. Durch ein *negatives crossmatch* im Vorfeld der Transplantation lässt sich diese Form der Abstoßung heute weitestgehend vermeiden. Dabei wird Serum des Patienten mit B- und T-Zellen einer repräsentativen Mischung von verschiedenen Personen (panel) inkubiert und auf An- bzw. Abwesenheit von präformierten Antikörpern (*panel reactive antibodies*, PRA) untersucht (Katznelson et al. 2001).

*Akute Abstoßungen* treten innerhalb weniger Wochen, aber auch noch mehrere Monate nach Transplantation auf. Etwa 90 % der Fälle sind zelluläre Abstoßungen, unter Beteiligung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (in der Anfangsphase), CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (im weiteren Verlauf), Natürlichen Killerzellen (NKZ), IL-2 und IFN- $\gamma$ . In 5-10 % der Fälle handelt es sich um Antikörper vermittelte humorale Abstoßungen, deren Therapie sich relativ schwierig gestaltet.

Bei Nierentransplantationen ist als klinisches Symptom oftmals nur ein Anstieg des Serumkreatinins festzustellen, der allgemein auf eine Verschlechterung der Nierenleistung hinweist und auch Folge einer Medikamentenintoxikation sein kann. Eine sichere Diagnosemöglichkeit bietet die perkutane Nierenbiopsie (Solez et al. 1985). Ein markanter Anhaltspunkt im Biopsat für eine aktuelle akute Abstoßung ist die Infiltration von Leukozyten in die Nierentubuli. Die Therapie erfolgt primär mit einer Bolusinjektion von zumeist 500 mg Prednisolon. Bei steroidresistenten Abstoßungen kommen mono- oder polyklonale Antikörper zum Einsatz (Helderman und Goral 2001, Neumayer 2001).

Die *chronische Abstoßung* (chronische Transplantatnephropathie) tritt meist nach Monaten bis Jahren auf und ist die Hauptursache für einen Transplantatverlust. Die zugrunde liegenden Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen Abstoßung sind vielfältig und nicht endgültig geklärt. Man unterscheidet Alloantigen-abhängige und –unabhängige Auslöser.

Tabelle 1: Beispiele für Risikofaktoren bei der Entstehung einer chronischen Transplantatabstoßung.

Alloantigen-abhängig	Alloantigen-unabhängig
akute Abstoßungen	verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats
HLA-mismatches	Spenderalter
Anzahl präformierter Antikörper	reduzierte Nierenmasse
suboptimale Immunsuppression	CMV-Infektion
mangelnde Patienten-Compliance	pharmakainduzierte Neurotoxizität

Die chronische Abstoßung eines Nierentransplantats äußert sich vor allem in Veränderungen in Gefäßen, Tubuli, Glomeruli und im Interstitium. Dazu zählen die Bildung einer Neointima, Intimafibrose, ischämische Glomerulopathie, interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie. Die chronische Transplantatnephropathie lässt sich auch als langsamer progredienter Entzündungsprozess interpretieren. Zur Behandlung der chronischen Abstoßung stehen derzeit keine medikamentösen Optionen zur Verfügung, so dass es sich um ein Hauptproblem der Transplantationsmedizin handelt (Kasiske 2001, Nast und Cohen 2001).

## 1.3 Ciclosporin

### 1.3.1 Chemische Eigenschaften

Ciclosporin ist ein zyklisches Undecapeptid, das vom Pilz *Tolypocladium inflatum* Gams gebildet wird. Alle Aminosäuren dieses Peptids liegen in der S-Konfiguration der natürlichen L-Aminosäuren vor, außer dem R-konfigurierten D-Alanin in Position 8. Mit Ausnahme der Positionen 2, 5, 7 und 8 sind alle Aminosäuren N-methyliert (Wenger 1990). An Position 1 befindet sich mit N-Methyl-4-butenyl-4-methyl-threonin (MeBmt) eine bis dahin unbekannte Aminosäure, die für die Wirksamkeit von Ciclosporin von entscheidender Bedeutung ist. Geringfügige Veränderungen an dieser Aminosäure, wie N-Demethylierung zu Bmt haben Wirkungseinbußen bzw. einen Wirkverlust zur Folge (Wenger 1986). Insgesamt sind die Aminosäuren an den Positionen 1, 2, 3 und 11 sowie die cyclische Struktur des Moleküls für die immunsuppressive Wirkung verantwortlich.

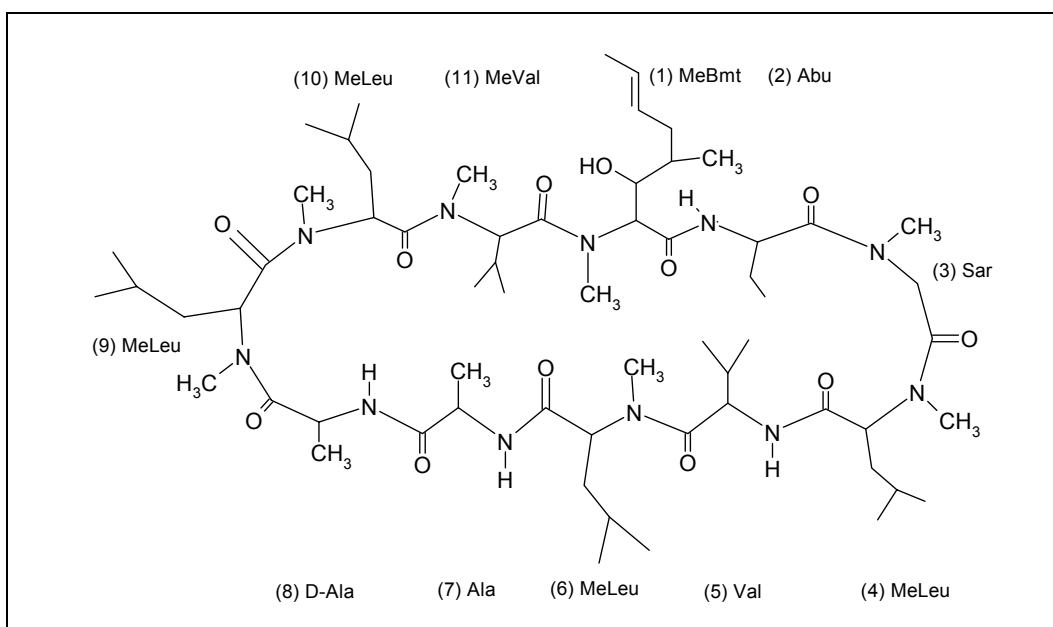


Abbildung 2: Strukturformel von Ciclosporin

Ciclosporin ist ein weißes bis nahezu weißes, feinkristallines Pulver. Die Substanz ist sehr lipophil mit einer Löslichkeit in Wasser (25 °C) von 0,04 mg/g, in Ethanol (25 °C) von über 100 mg/g und in physiologischer Kochsalzlösung (22 °C) von 1 mg/g. Das Molekulargewicht beträgt 1202 Dalton.

### 1.3.2 Pharmakodynamik

Ciclosporin zählt wie auch Tacrolimus (FK506) zur Gruppe der *Calcineurin-Inhibitoren*. Calcineurin ist eine Calcium- und Calmodulin-abhängige Serin-Threonin Phosphatase (Fruman et al. 1992), die im menschlichen Organismus vor allem im Gehirn (Stemmer und Klee 1991), aber auch in der glatten Muskulatur (Fraser und Walsh 1995), den Nieren (Tumlin 1997) und in T-Zellen (Kincaid et al. 1987, Alexander et al. 1988) lokalisiert ist. Es erfüllt im Organismus zahlreiche Aufgaben, wie die Signaltransduktion in T-Zellen, Neurotransmitterfreisetzung im Gehirn und Regulation der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase in den Nephronen. Das Enzym besteht aus einer

katalytischen (A) und einer regulatorischen (B) Einheit. Das aktive Zentrum ist unter Ruhebedingungen durch eine autoinhibitorische Domäne blockiert. Durch einen intrazellulären Anstieg von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kann Calmodulin an die A-Untereinheit binden, wodurch das aktive Zentrum des Enzyms freigegeben wird. In Folge der Aktivierung von Calcineurin kommt es zur Dephosphorylierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, darunter auch des *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (Loh et al. 1996, Luo et al. 1996). NFAT, wie auch AP-1 und NF $\kappa$ B sind für die Transkription der Gene zahlreicher Zytokine (u.a. IL-2, IFN- $\gamma$ ) erforderlich, die ihrerseits T-Zellen aktivieren (Rao 1995).

Erkennt und bindet eine T-Zelle ein spezifisches Antigen, präsentiert zusammen mit einem MHC-Molekül, so wird über eine Tyrosinkinase die Phospholipase- $\text{C}\gamma$  ( $\text{PLC}\gamma$ ) aktiviert. Diese katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ). DAG aktiviert die Proteinkinase-C (PKC), die an der Synthese nukleärer Regulationselemente wie den Protoonkogenen c-fos und c-jun beteiligt ist.  $\text{IP}_3$  setzt  $\text{Ca}^{2+}$  aus seinem intrazellulären Speicher, dem endoplasmatischen Retikulum, frei (Clapham 1995).  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Calmodulin und dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex aktiviert unter anderem Calcineurin (Fruman et al. 1992).

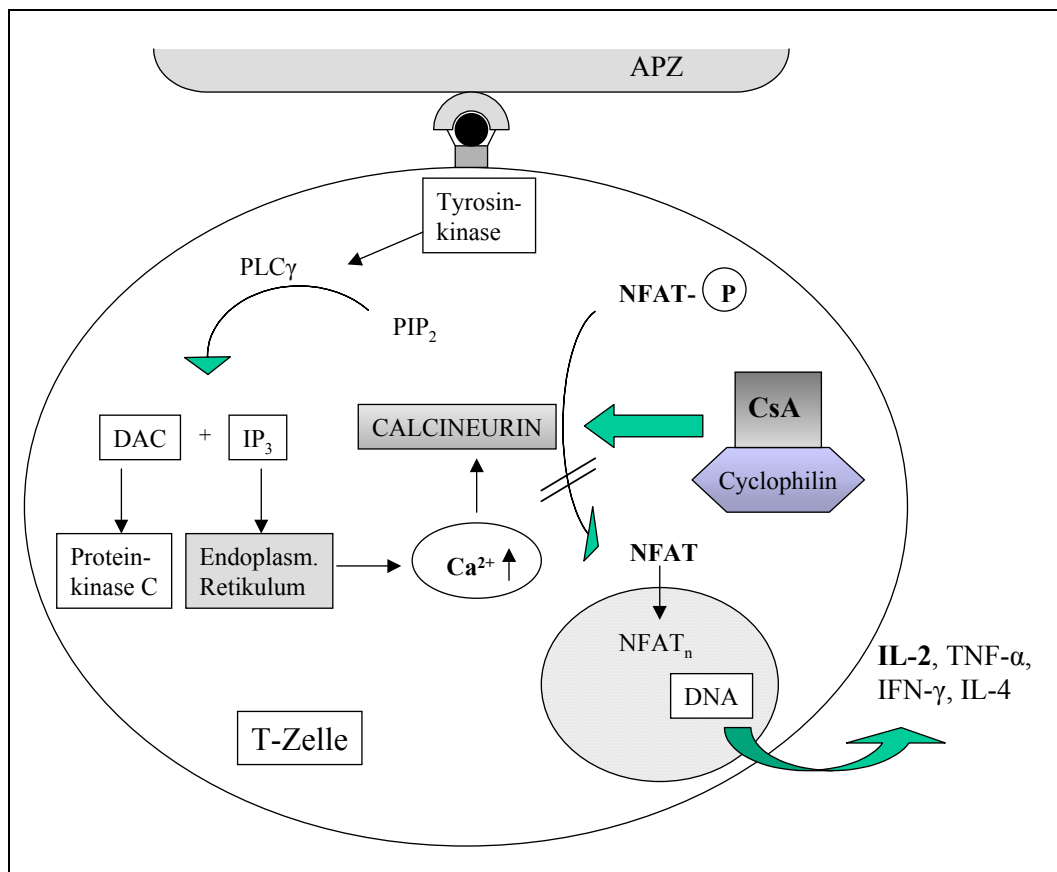


Abbildung 3: Intrazelluläre Signaltransduktion bei der T-Zell-Aktivierung (nach Helderman und Goral 2001); Erklärung im Text.

Diese intrazelluläre Reaktionskaskade wird von Ciclosporin unterbrochen. Es bindet in T-Helfer-Zellen an ein zytoplasmatisches immunkompetentes Protein (Immunophilin) namens *Cyclophilin* (Morris 1994). Dies ist eine Prolyl-cis-trans-Isomerase (Rotamase), die für die Proteinfaltung

verantwortlich ist. Die Bindung von Ciclosporin an Cyclophilin ist nicht für die immunsuppressive Wirkung verantwortlich. Vielmehr lagert sich der Ciclosporin-Cyclophilin-Komplex an Calcineurin an und bildet somit einen ternären Komplex (Liu et al. 1991, Clipstone und Crabtree 1992). Durch diese Komplexierung ist Calcineurin nicht mehr in der Lage, den zytosolischen NFAT zu dephosphorylieren. Somit unterbleibt die Translokation des NFAT in den Nukleus und folglich auch die Gentranskription von IFN- $\gamma$ , Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und zahlreicher Interleukine, vor allem des IL-2. Als Konsequenz wird die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen gehemmt. Die Calcineurin-Inhibition steht in direktem Bezug zur Konzentration von Ciclosporin im Blut und erreicht ein Maximum von 70-96 % im Bereich der Ciclosporin-Maximalkonzentration (Halloran et al. 1999). Es kommt demzufolge nur zu einer partiellen Hemmung. Die spezifische Wirkung von Ciclosporin ist durch das ausschließliche Vorkommen von NFAT in T-Zellen bedingt. Die Aktivität phagozytierender Zellen und damit die Abwehr von Bakterien wird kaum beeinflusst.

Ciclosporin ist indiziert zur Prophylaxe der Transplantat-Abstoßung nach allogenen Transplantationen von Niere, Leber, Herz, Herz-Lunge, Lunge, Pankreas und nach Knochenmark-Transplantationen. Weitere zugelassene Anwendungsgebiete sind schwere therapieresistente Formen der Psoriasis, der atopischen Dermatitis, schwere endogene Uveitis, schwere aktive rheumatoide Arthritis und steroidabhängiges und steroidresistentes nephrotisches Syndrom. Darüber hinaus wurde Ciclosporin bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen, wie entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Thygeson und Behcet-Krankheit, erfolgreich getestet (Lim et al. 1996, Robert et al. 2001, Hanauer und Present 2003).

### ***1.3.3 Unerwünschte Wirkungen***

Die unerwünschten Wirkungen von Ciclosporin sind in der Regel dosisabhängig, reversibel und sprechen auf eine Dosisreduktion an. Eine optimale Therapiesteuerung kann deshalb die Rate unerwünschter Wirkungen senken.

Als häufigste Komplikation tritt eine Verschlechterung der Nierenleistung auf, die sich im Anstieg der Serumspiegel von Kreatinin und Harnstoff äußert. Bei der akuten Nephrotoxizität handelt es sich vorwiegend um funktionelle Veränderungen. Durch eine Erhöhung des vaskulären Widerstands kommt es zu einer Verminderung des renalen Blutflusses und dem Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (Bennett 1996, Olyaei et al. 1999). Die Erhöhung des vaskulären Widerstands ist die Folge einer Vasokonstriktion der afferenten Gefäße, ausgelöst durch eine Verschiebung des Gleichgewichts von vasodilatatorischen und –konstriktorischen Mediatoren zugunsten letzterer (Van Buren et al. 1994). Prominent sind der Anstieg von Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) und Endothelin, sowie die Reduktion von dilatierenden Prostaglandinen und NO (Rodicio 2000).

Die chronische Nephrotoxizität ist dagegen mit strukturellen Veränderungen, wie Vergrößerung des Mesangiums, interstitieller Fibrose und schließlich irreversibler Nephrosklerose verbunden (Kopp und Klotman 1990, Andoh und Bennett 1998). Das Risiko einer ernsthaften Einschränkung der Nierenfunktion nimmt bei Comedikation nephrotoxischer Arzneimittel (nichtsteroidale Antiphlogistika, Aminoglykoside) zu.

Eine häufig beobachtete Nebenwirkung ist die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie. Auch hier spielt die Dysbalance von vasokonstriktorischen und –dilatatorischen Mediatoren eine bedeutsame Rolle (Zeier et al. 1998, Oriji 2003). In der Frühphase der Hypertonie ist ein erhöhter Sympathikustonus (Grobecker et al. 1995), im weiteren Verlauf auch eine Hyperreaktivität auf vasokonstriktorische Reize beteiligt (Textor et al. 1994). Die Verminderung der GFR führt zu einer Natrium- und Wasserretention, die ebenfalls zum Anstieg des Blutdrucks



beiträgt (Koomans und Ligtenberg 2001). Bei intravenöser Gabe von Ciclosporin zeigt auch der Emulgator Chremophor EL hypertensives Potential (Brunkwall und Bergqvist 1993, Hardy et al. 2000). Die Behandlung der Hypertonie bietet bei kombiniertem Einsatz von Calcium-Antagonisten und Diuretika die besten Erfolgsaussichten (Rahn et al. 1999, Kew und Curtis 2000). Nifedipin ist dabei kontraindiziert, da es Gingivahyperplasie hervorrufen kann. Diese zählt zu den häufigen unerwünschten Wirkungen von Ciclosporin. Kaliumsparende Diuretika sollen ebenfalls nicht angewendet werden, da Ciclosporin zu einer Hyperkaliämie führen kann. Weitere häufig beobachtete unerwünschte Wirkungen sind u.a. Hyperlipidämie, neurologische Beschwerden (Tremor, Parästhesien der Extremitäten) und Hypertrichose.

### **1.3.4 Pharmakokinetik**

#### **1.3.4.1 Absorption und Bioverfügbarkeit**

Die Pharmakokinetik von Ciclosporin ist durch eine ausgeprägte inter- und intraindividuelle Variabilität gekennzeichnet (Freeman 1991, Fahr 1993). Ein wichtiger Einflussfaktor ist die schwankende und unvollständige Resorption von Ciclosporin aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) (Kahan 1989, Drewe et al. 1992). Die Aufnahme des Wirkstoffs hängt ihrerseits von der Geschwindigkeit der Magenentleerung (Drewe et al. 1992), der Resorptionsfläche des Darms, der Darmdurchblutung, dem pH-Wert der Formulierung und des Darminhalts (Kahan 1999 b), der Zusammensetzung und Menge der Galle- und Pankreassekretion (Tredger et al. 1988, Fahr 1993) und vom Ausmaß der intestinalen Metabolisierung (Tjia et al. 1991) ab. Darüber hinaus spielt die Nahrungsaufnahme eine wichtige Rolle. Fettreiche Mahlzeiten im Zusammenhang mit der Applikation von Ciclosporin können die Resorption deutlich erhöhen (Gupta et al. 1990, Honcharik et al. 1991). Der Einfluss von Nahrung ist jedoch bei verschiedenen Ciclosporin-Formulierungen unterschiedlich ausgeprägt (Mueller et al. 1994 a). Ciclosporin ist außerdem ein Inhibitor der Multidrug Efflux Pumpe *P-glykoprotein* (P-gp) (Hooiveld et al. 2000). Dieses Transportsystem erfüllt eine effiziente Barrierefunktion (Seelig und Landwojtowicz 2000) und ist entsprechend an der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Testis-Schranke beteiligt (Schinkel et al. 1999). Sie ist aber auch hochkonzentriert in Enterozyten des Dünndarms (Benet et al. 1999), in der Leber und in der Niere zu finden, wo sie exkretorisch wirkt. Ciclosporin induziert dosisabhängig und reversibel renales (Liu und Brunner 2001) und hepatisches P-gp (Bai et al. 2001 a) bei Ratten. Intestinales P-gp schleust Substrate direkt ins Darmlumen zurück und ist deshalb für Schwankungen in der Bioverfügbarkeit einer Reihe von Pharmaka verantwortlich (Hooiveld et al. 2000). Bei einem darmtransplantierten Patienten wurde die auffallend niedrige Bioverfügbarkeit von Ciclosporin mit einer sehr hohen P-gp-Aktivität im Ileum in Verbindung gebracht (Kaplan et al. 1999). Die gezielte Inhibierung von P-gp zur Überwindung von Multidrug-Resistenzen galt in der Chemotherapie als viel versprechender Ansatz. In vitro war es möglich, durch den Einsatz des Cyclosporin D-Analogons Valspodar Resistenzen gegen zytostatische Wirkstoffe zu überwinden (Mueller et al. 1997). In klinischen Studien an größeren Patientenkollektiven konnte die Wirksamkeit von Valspodar allerdings nicht bestätigt werden (Gruber et al. 2003, Thomas und Coley 2003).

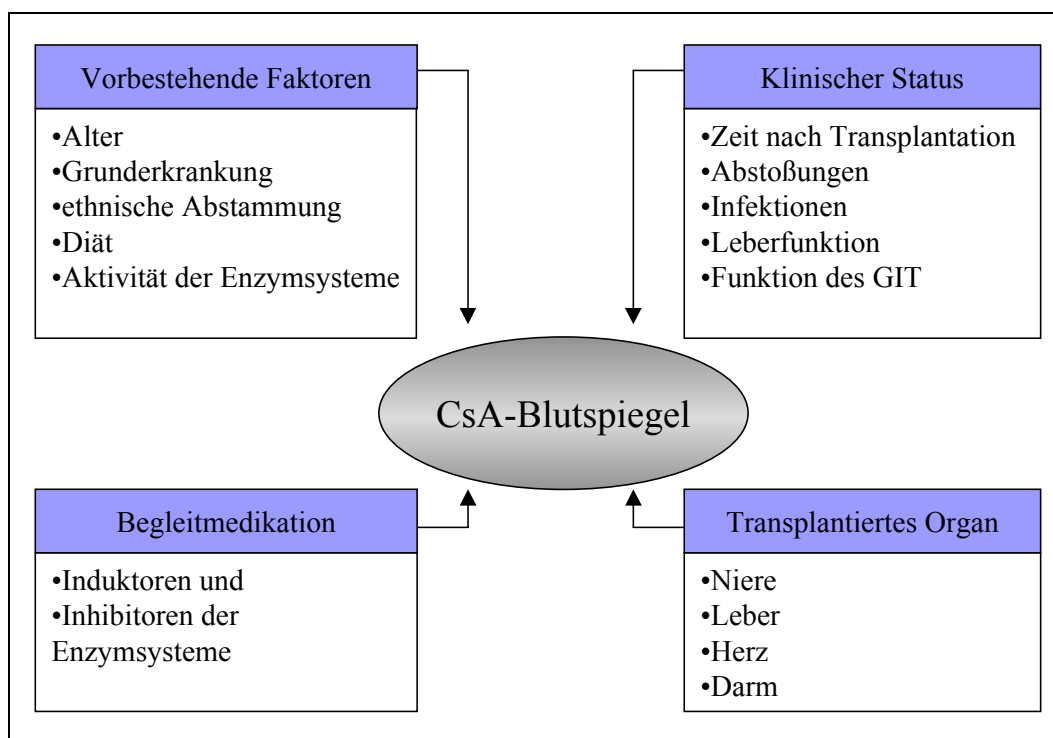


Abbildung 4: Potentielle Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik von Ciclosporin (nach Christians et al. 2000).

Auf einige dieser Einflussfaktoren soll im folgenden stichpunktartig näher eingegangen werden.

Alter: Kinder benötigen eine höhere Ciclosporin-Dosierung als Erwachsene (Humbert et al. 1994), u.a. aufgrund der kleineren Resorptionsfläche und einer höheren Clearance.

Grunderkrankung: Transplantationspatienten, die unter Diabetes mellitus leiden, resorbieren Ciclosporin zum Teil schlechter als Patienten ohne Diabetes (Chapman et al 1996).

Ethnische Zugehörigkeit: Afroamerikaner weisen gegenüber Kaukasiern eine signifikant erniedrigte Resorption auf (Lindholm et al. 1992, Lindholm und Kahan 1993).

Diät: Neben den bereits geschilderten signifikanten Auswirkungen von fettreicher Ernährung, beeinflussen zahlreiche Nahrungs- und Genussmittel die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin. Dazu zählen u.a. Grapefruitsaft (Enzyminhibitor) (Kane und Lipsky 2000), Apfelsaft (Henney 2000) und Rotwein (Tsunoda et al. 2001).

Begleitmedikation: Neben den hinlänglich bekannten CYP450-Inhibitoren (Calcium-Antagonisten, Makrolidantibiotika) und –induktoren (Barbiturate, Antiepileptika) sorgte in jüngerer Vergangenheit Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) für Furore. Nach kurzfristiger Einnahme eines hypericinhaltigen Medikaments halbierten sich bei Herztransplantierten die Ciclosporinspiegel mit resultierender Organabstoßung (Ruschitzka et al. 2000). Hypericin ist ein Enzyminduktor.

Zeit nach Transplantation: Ciclosporin offenbart eine zeitabhängige Resorption. In einer Studie an 86 de novo nierentransplantierten Patienten sank auch noch 12 Wochen postoperativ die zur Aufrechterhaltung einer konstanten Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) benötigte Dosis Sandimmun<sup>®</sup>, d.h. die Bioverfügbarkeit stieg in diesem Zeitraum stetig an. Unter

Therapie mit Sandimmun® Optoral waren die Ciclosporinspiegel bereits nach 4 Wochen stabil (Taesch und Neise 1994, Kovarik et al. 1996 a). Die steigende Bioverfügbarkeit von Ciclosporin könnte bei Nierentransplantierten mit einer verbesserten Absorption des präoperativ urämischen Gastrointestinaltrakts zusammenhängen (Danovitch 2001).

Transplantiertes Organ: Im Vergleich zur Nierentransplantation ist die Absorption von Ciclosporin bei Knochenmark-Transplantationen aufgrund von GIT-Störungen reduziert. Dies ist auch bei Lebertransplantationen der Fall, hier aber aufgrund der beeinträchtigten Gallefunktion (Johnston et al. 1997). Unter der Therapie mit Optoral zeigten sich hier, im Unterschied zu Sandimmun®, keine Abweichungen, da mit dieser neuen Formulierung eine von Galle unabhängige Resorption gewährleistet ist (Mueller et al. 1995, Levy 1999).

Der Einfluss der Formulierung auf die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin wird unter Punkt 1.3.5 gesondert behandelt.

#### 1.3.4.2 Metabolisierung und Ausscheidung

Ciclosporin wird über Enzyme der Cytochrom-P450-Superfamilie (CYP450) verstoffwechselt. Beim Menschen erfolgt dies primär über die Isoform CYP-3A4 (Benet et al. 1999), bei der Ratte dagegen über CYP-3A2 und CYP-2C11 (Brunner et al. 2000). Die Enzymverteilung und damit die Pharmakokinetik ist bei Ratten vom Alter und Geschlecht der Tiere abhängig. Weibchen zeigen eine geringere Bioverfügbarkeit bei deutlich höherer Konzentration an P-gp (Molpeceres et al. 2000). Beim Menschen sind keine geschlechtsspezifischen Abweichungen bekannt. Ciclosporin wird nicht nur in der Leber, sondern zu einem Großteil bereits im Darm metabolisiert (Kolars et al. 1991, Hoppu 1991, Wu et al. 1995). CYP-3A4 ist neben seinem hepatischen Vorkommen auch hochkonzentriert in den Enterozyten der Darmwand lokalisiert, wo es zusammen mit P-gp offenbar als intestinale Barriere fungiert. Erkrankungen des Darms, wie Morbus Crohn, können deshalb bedeutsame Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit haben (Brynskov et al. 1992). Die Verteilung im Körper ist, bedingt durch die ausgeprägte Lipophilie von Ciclosporin, in der Leber, dem Pankreas und dem Fettgewebe am höchsten. 50 – 70 % der Gesamtdosis von Ciclosporin sind im Blut zellulär gebunden, der Rest überwiegend an Lipoproteine. Vom zellulär gebundenen Anteil sind ca. 80 % an Erythrozyten lokalisiert (Hinderling 1997). Ciclosporin wird überwiegend biliär und nur zu 6 % renal ausgeschieden (Maurer und Lemaire 1986). Die Verstoffwechselung im Darm ist in ihrer Kapazität limitiert und scheint absättigbar (Lindberg-Freij und Karlsson 1994). Damit ist der first-pass-Metabolismus von Ciclosporin direkt von der Resorptionsgeschwindigkeit und folglich auch von der Galenik der Arzneiform abhängig.

Die Nomenklatur der Metaboliten wurde 1990 auf einer Consensus Konferenz vereinheitlicht (Kahan et al. 1990). Die Metaboliten werden nach der, von der Metabolisierung betroffenen Aminosäure (AS) benannt, entsprechende Suffixe kennzeichnen die Art der Reaktion.

- Kein Suffix = Hydroxylierung
- N = N-Demethylierung
- c = Cyclisierung
- AL, A = Oxidation bis zum Aldehyd bzw. zur Carbonsäure

So deutet beispielsweise die Bezeichnung AM4N auf eine N-Demethylierung der AS an Position 4 hin, AM1 entsteht durch Hydroxylierung der AS an Position 1 (1-β) und AM1c resultiert aus dem Ringschluss des Restes der AS1.

Bis heute wurden über 40 verschiedene Metaboliten isoliert, die alle die intakte Peptidstruktur der Muttersubstanz aufweisen und sich von drei Hauptmetaboliten ableiten: AM1, AM9 und AM4N (Christians et al. 1991 a, Khoschorur et al. 1998, Hamwi et al. 2000). Diese primären Metaboliten entstehen direkt aus Ciclosporin durch Hydroxylierung bzw. N-Demethylierung und sind im Blut von Nierentransplantierten vorherrschend (Kovarik et al. 1994 a). AM1c nimmt aufgrund seiner Cyclisierung eine Sonderstellung unter den Metaboliten ein. In vitro konnte gezeigt werden, dass die Entstehung direkt aus Ciclosporin aber auch über AM1 erfolgt (Christians et al. 1991 a). Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich mit der Untersuchung immunsuppressiver und toxischer Wirkungen der Metaboliten beschäftigt. Radeke und Kollegen wiesen in glomerulären Mesangialzellen einen signifikant antiproliferativen Effekt bei Kombination der drei Hauptmetaboliten nach (Radeke et al. 1991). Unter Einbeziehung sekundärer Metaboliten wurde ein synergistischer Effekt erzielt. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen denen im Urin lebertransplantiierter Patienten. Mehrere einzelne Metaboliten (u.a. AM1, AM9, AM1c) zeigten in vitro einen hemmenden Effekt auf stimulierte Rattenlymphozyten. AM1 erreichte 20 % der immunsuppressiven Aktivität des Ciclosporins und scheint in vivo die wichtigste Rolle unter den Metaboliten zu spielen (Radeke et al. 1992). AM1 und in geringerem Ausmaß auch AM9 und AM4N wirkten in einer Kultur humaner Leukozyten inhibitorisch auf deren Aktivität (Rosano et al. 1986). AM1 und AM9 reduzierten auch die DNA-, RNA- und Proteinsynthese in Mesangialzellen von Schweinen (Cole et al. 1989). Bei Psoriatikern, die unter Ciclosporintherapie an nephrotoxischen Begleiterscheinungen litten, waren nach 7 Wochen die AM1-Konzentrationen im Vergleich zur Basislinie signifikant erhöht (Furlanut et al. 1996). Lebertransplantierte mit Nephrotoxizität wiesen signifikant gesteigerte Spiegel von AM1c9 und AM19 im Vergleich zu Patienten ohne diese Ciclosporin-Nebenwirkung auf (Christians et al. 1991 b). Cholestase und Abstoßungsperioden der Leber waren mit einem Anstieg der AM19 und AM1A Werte assoziiert (Christians et al. 1991 c). Diese Daten attestieren verschiedenen Metaboliten das Potential, zur immunsuppressiven Wirkung von Ciclosporin aber auch zu dessen unerwünschten Wirkungen beizutragen.

### ***1.3.5 Wechselwirkungen von Ciclosporin mit anderen Substanzen***

Ciclosporin wird im Darm und in der Leber durch CYP-3A-Enzyme intensiv metabolisiert. Dadurch ergeben sich Interaktionen mit zahlreichen Substanzen, die ebenfalls über dieses Enzymsystem verstoffwechselt werden bzw. dessen Aktivität hemmen oder induzieren. Enzyminhibitoren (Calcium-Antagonisten, Ketokonazol, orale Kontrazeptiva, Makrolid-Antibiotika, u.a.) können die Blutspiegel von Ciclosporin erhöhen, Enzyminduktoren (Antiepileptika, Rifampicin, Metamizol, Hypericin, u.a.) führen dagegen zu einer Absenkung. Die Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von Ciclosporin kann in einer Unter- oder Überdosierung resultieren und dadurch zu einer Abstoßung des Transplantats oder zu schweren Nebenwirkungen führen. Bei der Kombination mehrerer Immunsuppressiva ist das erhöhte Infektionsrisiko und die Gefahr der Bildung maligner Neoplasmen zu beachten. Die gleichzeitige Gabe nierenschädigender Pharmaka (Aminoglykoside, nichtsteroidale Antiphlogistika, u.a.) kann die nephrotoxische Wirkung von Ciclosporin verstärken. Aus der Comedikation von CSE-Hemmern (Statine), Digoxin oder Diclofenac mit Ciclosporin kann in einer Verschlechterung der Clearance resultieren. Die Kombination von Diclofenac mit Ciclosporin kann zu einem signifikanten Anstieg der Bioverfügbarkeit des Antiphlogistikums führen (Kovarik et al. 1996 b).

### 1.3.6 Galenik ciclosporinhaltiger Formulierungen

Ciclosporin wurde in den 1980er Jahren als Sandimmun® in Form von Kapseln und einer Lösung in den Handel gebracht. Der Wirkstoff liegt in Maiskeimöl gelöst vor. Nach peroraler Applikation bildet sich im Magensaft mit Hilfe von Gallensalzen eine Öl-in-Wasser (o/w) Emulsion. Die Öltröpfchen werden von Pankreaslipase verdaut und Ciclosporin in den entstehenden Monoglyceriden mit Gallensalzen unter Bildung von Mischmizellen solubilisiert. Aus diesen Mizellen wird Ciclosporin letztlich resorbiert (Vonderscher und Meinzer 1994, Gershanik und Benita 2000). Die Absorption von Ciclosporin aus Sandimmun® hängt somit ganz entscheidend vom Gallenfluss ab. Fettreiche Nahrung führt zu einer vermehrten Gallensekretion und kann somit die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin deutlich vergrößern (Ptachcinski et al. 1985, Gupta et al. 1990, Mueller et al. 1994 a). Insgesamt stellt die große pharmakokinetische Variabilität ein Problem in der Therapie mit Sandimmun® dar. Gerade in der frühen postoperativen Phase ist das Erreichen der Zielspiegel durch die geringe und variable Resorption von Ciclosporin erschwert (Lemaire et al. 1990, Lindholm 1991). Dies gilt insbesondere für Lebertransplantationen, bei denen eine anfänglich eingeschränkte Organfunktion und eine externe Gallendrainage Resorptionsprobleme nach sich ziehen (Mehta et al. 1988). Aus diesem Grund wird in den ersten postoperativen Tagen häufig auf die intravenöse Gabe von Ciclosporin ausgewichen. Diese ist allerdings mit verstärkten neurologischen und renalen Komplikationen verbunden (Haller 1996). Zudem besitzt der, für die parenterale Applikation verwendete Emulgator Chremophor EL ein hypertensives Potential (Brunkwall und Bergqvist 1993, Hardy et al. 2000).

Mit der Entwicklung von Sandimmun® Optoral (internationale Bezeichnung: Sandimmun® Neoral) konnte diesen Schwierigkeiten begegnet werden. Optoral ist ein *self-microemulsifying-drug-delivery-system* (SMEDDS). Der Wirkstoff ist gelöst in Maisölglyceriden, dem hydrophilen Lösungsmittel Propylenglykol, dem Antioxidans Tocopherol und dem Emulgator Macrogol-Glycerolhydroxystearat (HLB 14-16) (Novartis Pharma 2002). Nach dem Auflösen der Kapseln bildet sich im wässrigen Milieu des Magens spontan eine Mikroemulsion (Gershanik und Benita 2000). Eine Mikroemulsion enthält, wie auch eine normale Emulsion, hydrophile, lipophile und amphiphile Komponenten, jedoch in einem eng begrenzten Mischungsverhältnis. Im Gegensatz zu normalen Emulsionen, die grundsätzlich ein Mehrphasensystem nicht mischbarer Flüssigkeiten darstellen, bildet sich bei Optoral ein klares, thermodynamisch stabiles Einphasensystem (Vonderscher und Meinzer 1994), das einer echten Lösung relativ nahe kommt. Allerdings haben Mikroemulsionen auch Eigenschaften, wie sie von Emulsionen bekannt sind (Tyndalleffekt), so dass eine Zuordnung schwer fällt.

Die Emulgierung durch Gallensalze ist für die Resorption von Optoral nicht mehr nötig (Mueller et al. 1995, Levy 1999). In zahlreichen Patientenkollektiven zeigte Optoral eine, dem Sandimmun® signifikant überlegene Bioverfügbarkeit. Eine höhere und gleichzeitig weniger variable Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve, AUC) konnte in Studien an Nieren- (Keown et al. 1998 a, Cole et al. 1998), Leber- (Hemming et al. 1996, Otto et al. 1998), und Herztransplantierten (Eisen et al. 1999) nachgewiesen werden. Diese Überlegenheit war bemerkenswerterweise auch bei bekannten Sandimmun®-Malabsorbern zu finden (Färber et al. 1994, Belitzky et al. 2000). Die Umstellung vom klassischen Sandimmun® auf Sandimmun® Optoral hat keine negativen Auswirkungen auf die Sicherheit und Verträglichkeit (Neumayer et al. 1996). Vielmehr war die Therapie mit Optoral im Vergleich zu Sandimmun® mit einer signifikant niedrigeren Inzidenz akuter Abstoßungen verbunden (Keown et al. 1998, Mahalati et al. 1999, Grant et al. 1999). Eine Meta-Analyse von knapp 50 Studien, in denen der Therapieeffekt unter Sandimmun® mit Optoral verglichen wurde, bestätigte diese Erkenntnis (Shah et al. 1999). Die verbesserte Bioverfügbarkeit sowie die reduzierte Variabilität

von Optoral sind eventuell in einem beschleunigten transepithelialen Transport vom Darmlumen in das Pfortaderblut begründet. Dadurch könnte die Kapazität des intestinalen CYP-3A4-Metabolismus wie auch die Effluxleistung von P-gp überschritten werden (Lindberg-Freijs und Karlsson 1994, Kahan 1998). Generell wurde eine hohe Variabilität in der Bioverfügbarkeit von Ciclosporin als Risikofaktor für akute (Savoldi et al. 1997) und chronische Abstoßungen (Kahan 1998) identifiziert, die zudem einen Anstieg der Behandlungskosten nach sich zieht (Belitzky et al. 2000, Kahan et al. 2000 a).

### **1.3.7 Therapeutic Drug Monitoring (TDM)**

Neben der intra- und interindividuellen Variabilität wirkt sich ein schmales therapeutisches Fenster komplizierend auf die Anwendung von Ciclosporin aus, d.h. der Bereich zwischen subtherapeutischen und toxischen Konzentrationen ist relativ eng. Eine einheitliche Dosierung aller Patienten ist aus diesem Grund nicht möglich und die Einstellung anhand von Blutspiegelbestimmungen unerlässlich. Die AUC gibt das Ausmaß wieder, mit dem der Wirkstoff im systemischen Kreislauf verfügbar wird und stellte sich als empfindlichster Prädiktor für den therapeutischen Effekt von Ciclosporin heraus (Keown et al. 1998 b). Die Messung einer vollen Kinetik über 12 oder 24 Stunden ist in der klinischen Routine nicht praktikabel und aufgrund der häufigen Blutentnahmen auch den Patienten nicht zumutbar. Zur Dosisfindung hat sich deshalb eine Einpunktmessung etabliert, bei welcher der *Talblutspiegel* ( $C_0$ ) herangezogen wird (Oellerich et al. 1995). Dies ist die Blutkonzentration von Ciclosporin 12 Stunden nach Einnahme der letzten Medikation und damit direkt vor erneuter Applikation (12-Stunden-Dosierungsintervall). Der Großteil der Patienten konnte mit dieser Methode adäquat therapiert werden. Allerdings gab es auch Patienten, die Abstoßungsepisoden erlitten obwohl ihr  $C_0$  innerhalb des Zielbereichs lag. Dies wäre ein Indiz für Unterdosierung trotz vermeintlich optimaler Einstellung. Ebenso war oftmals ein Anstieg des Serumkreatinins zu verzeichnen. Dies kann einerseits die Folge einer Überdosierung und damit der nephrotoxischen Wirkung des Ciclosporins sein aber auch auf eine Abstoßungsreaktion und damit Unterdosierung hinweisen.

Mit der Einführung von Optoral konnte im Vergleich zum klassischen Sandimmun® die Korrelation des Talspiegels zur Gesamtexposition verbessert werden (Mueller et al. 1994 b). Darüber hinaus zeichnet sich Optoral durch eine erhöhte und gleichmäßigere Bioverfügbarkeit aus. Sowohl die AUC als auch die Maximalkonzentrationen ( $C_{max}$ ) unterliegen geringeren Schwankungen. In verschiedenen Konversionsstudien stellte sich heraus, dass sich die verbesserte Bioverfügbarkeit nicht in erhöhten Talspiegeln äußerte (Kovarik et al. 1994 b). Die  $C_0$ -Spiegel korrelierten trotzdem insgesamt nur mäßig mit der Gesamtexposition (Meyer et al. 1993, Mahalati et al. 1999). Aus diesem Grund suchte man nach neuen Möglichkeiten des *therapeutic drug monitorings*, die eine minimale Abstoßungsrate bei gleichzeitig minimaler Toxizität gewährleisten.

Johnston und Kollegen konnten mit einer Dreipunktmessung (3,5, 8 und 10 h nach Einnahme) eine Übereinstimmung von 99 % zur Gesamtexposition an nierentransplantierten Patienten erzielen (Belitzky et al. 2000). Wiederum war es diese Arbeitsgruppe, die in einer Analyse der pharmakokinetischen Daten von Nieren- und Herztransplantierten nachwies, dass die intra- und interindividuelle Variabilität innerhalb der ersten 4 Stunden nach Optoral-Applikation am größten ist (Johnston et al. 2000).

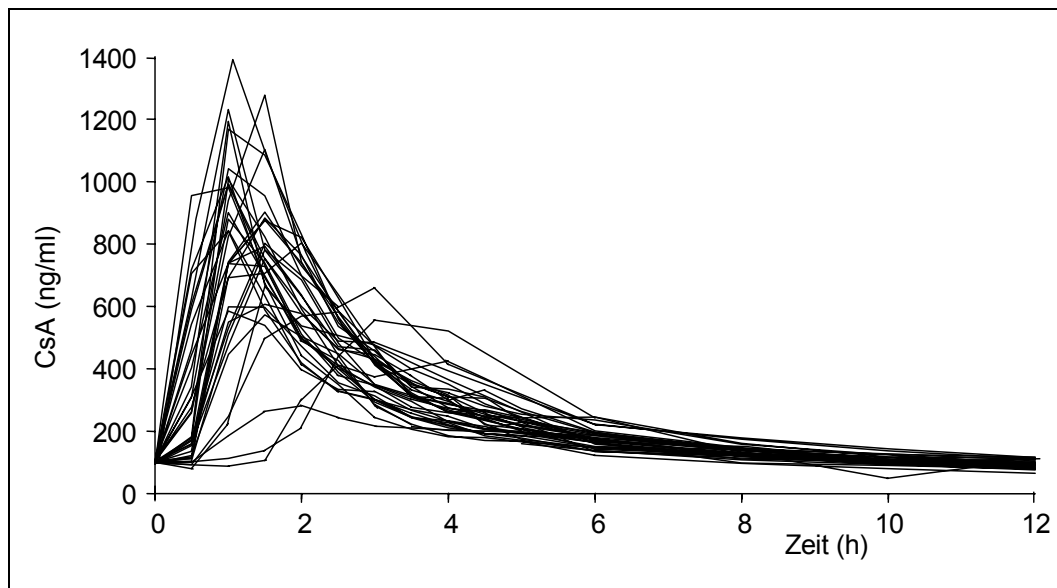


Abbildung 5: Konzentrations-Zeit-Kurven von Patienten nach Einnahme von Sandimmun® Optoral. Die interindividuelle Variabilität ist in den ersten 4 Stunden nach Applikation am höchsten. (präsentiert von B. Nashan beim Myproms-Meeting am 24.01.02, Berlin 2002)

Eine adäquate Ciclosporin-Absorption während dieser Phase ist für eine erfolgreiche Abstoßungsprophylaxe unerlässlich, zumal eine hohe Variabilität mit einem gesteigerten Risiko vor allem chronischer Abstoßungen verbunden ist. Pharmakodynamische Daten belegen außerdem den größten immunsuppressiven Effekt von Ciclosporin innerhalb dieser ersten 4 Stunden. So ist die Hemmung von Calcineurin direkt an die Ciclosporinspiegel gekoppelt, mit einer maximalen Inhibierung von 70-96 % etwa 2 Stunden ( $C_2$ ) nach Optoral-Einnahme (Halloran et al. 1999). Im Bereich von  $C_2$  ist auch ein signifikanter Abfall in der Anzahl IL-2-exprimierender  $CD4^+$ -T-Lymphozyten existent (Sindhi et al. 2000). Die  $AUC_{0-4h}$  beinhaltet damit nicht nur die wichtigsten pharmakokinetischen und -dynamischen Kriterien, sondern ist auch ein Prädiktor für die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Therapie. Retrospektiv zeigte bei de novo Nierentransplantatierten der  $AUC_{0-4h}$ -Wert zwischen den postoperativen Tagen 2 und 4 eine signifikante Korrelation mit akuten Abstoßungen. Patienten mit einer  $AUC_{0-4h}$  unter 4400 ng/ml\*h hatten eine höhere Rate an Abstoßungen, Werte über 5500 ng/ml\*h waren mit einem vermehrten Auftreten von Nephrotoxizität verbunden (Mahalati et al. 1999). Die Dosierung nach  $C_0$  war zur Vorausbestimmung akuter Abstoßungen hierbei nicht geeignet und korrelierte kaum mit der  $AUC_{0-4h}$ . In einer sich anschließenden prospektiven Studie wurden 55 nierentransplantierte Patienten anhand eines Zielspiegels von 4400-5500 ng/ml\*h eingestellt. Lediglich 3 % der Patienten, die im angestrebten Bereich lagen, erlitten im Beobachtungszeitraum von 3 Monaten akute Abstoßungen (Mahalati et al. 2001). In der Gruppe von Patienten, die den Zielspiegel nicht erreichten lag die Abstoßungsrate bei 45 % und die Konzentration an Serumkreatinin signifikant höher.

Trotz der vielfachen Vorteile der  $AUC_{0-4h}$  konnte sich dieses Verfahren in der Klinikroutine nicht durchsetzen, da eine mehrmalige Blutentnahme nicht praktikabel ist. In mehreren Studien wurde die Ciclosporin-Konzentration 2 Stunden nach Medikationseinnahme ( $C_2$ ) als der Einzelmesspunkt mit der höchsten Korrelation zur  $AUC_{0-4h}$  identifiziert (Cantarovich et al. 1998 b, Grant et al. 1999).  $C_2$  erlaubt nicht nur eine gute Vorhersage der Resorption von Optoral, sondern fällt auch mit der Maximalkonzentration und damit dem maximalen immunsuppressiven Effekt zusammen. Die Einstellung nach  $C_2$  bietet zudem die Möglichkeit, zwischen High-,

Intermediate- und Low-Absorbern zu unterscheiden und damit die Therapie eventuell sogar zu individualisieren (Levy et al. 2002). In zahlreichen mono- und multizentrischen Studien an nieren- und lebertransplantierten Patienten (u.a. MO2ART-Studie: Pfeffer et al. 2002) wurden bei Einsatz des  $C_2$ -Monitorings sehr gute Therapieergebnisse mit niedrigen Abstoßungsraten bei guter Verträglichkeit erzielt (Übersicht bei Nashan et al. 2002). Der Schweregrad der Abstoßungen ist unter  $C_2$ -Monitoring niedriger, das Risiko einer chronischen Abstoßung genauer vorhersehbar und die Nierenfunktion in der Langzeitbeobachtung verbessert. Das  $C_2$ -Monitoring erwies sich der Einstellung nach Talspiegeln ( $C_0$ ) insgesamt als überlegen und bietet zusätzlich ein Potential zur Kostenreduktion (Keown et al. 2001). Nach Meinung einer Expertenkommission stellt das  $C_2$ -Monitoring die ‚optimale‘ Form der Dosiseinstellung bei erwachsenen de novo Nieren- und Lebertransplantierten dar (Levy et al. 2002). Von dieser so genannten CONCERT-Gruppe (Consensus on Neoral  $C_2$ : Expert Review in Transplantation) wurden  $C_2$ -Zielspiegel für diese beiden Patientengruppen vorgeschlagen.

Tabelle 2:  $C_2$ -Zielspiegel (ng/ml) für erwachsene nieren- und lebertransplantierte Patienten (nach Levy et al. 2002).

Monate nach Transplantation	Nieren-Transplantation (ng/ml)	Leber-Transplantation (ng/ml)
2	1500	1000
3	1300	1000
4-6	1100	1000
7-12	900	800
> 12	800	600

Die Implementierung des  $C_2$ -Monitorings erfordert allerdings eine Adaption des Klinikbetriebes, da entgegen dem  $C_0$ -Monitoring die Blutentnahme zur Konzentrationsbestimmung nicht unmittelbar mit der Verabreichung der Medikation erfolgen kann. Die  $C_2$ -Blutprobe muss außerdem innerhalb eines relativ engen Toleranzzeitraumes von  $\pm 15$  Minuten abgenommen werden, da die Fehlerquote außerhalb dieses Zeitfensters zu hoch ist (Kahan et al. 2000 b). In Anbetracht der verhältnismäßig unkomplizierten Umsetzbarkeit dieser Maßnahmen, ist mit einer mittelfristigen Etablierung des  $C_2$ -Monitorings in den Transplantationszentren zu rechnen.

### 1.3.8 Bioäquivalenz ciclosporinhaltiger Formulierungen

In den USA lief im September 1995 der Patentschutz für das Ciclosporin-Produkt des Originalherstellers Novartis Pharma aus. In der Zwischenzeit sind weltweit zahlreiche *Generika* in den Markt eingeführt worden. Generika sind Arzneimittel die in der selben Arzneiform den gleichen Wirkstoff in gleicher Menge wie das Originalprodukt enthalten (pharmazeutische Äquivalenz). Sie können jedoch in den pharmazeutischen Hilfsstoffen hiervon abweichen. Für diese Nachahmerprodukte muss, im Gegensatz zum Erstanmelder, der Nachweis der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nicht mehr erbracht werden. Der Zweitanmelder kann hier auf die Daten des Originalherstellers Bezug nehmen (Arzneimittelgesetz (AMG) § 21) und somit die hohen Kosten vor allem der klinischen Studien einsparen. Voraussetzung für die Zulassung eines Generikums ist der Nachweis der Bioäquivalenz. Zwei Arzneimittel werden als bioäquivalent erachtet, wenn sie pharmazeutisch äquivalent oder alternativ sind und sich in ihrer Bioverfügbarkeit nach Verabreichung der selben molaren Dosis so gleichen, dass sich im Hinblick auf Wirksamkeit und Unbedenklichkeit im wesentlichen die selben Wirkungen ergeben. Die Bioäquivalenz gilt als erwiesen wenn die 90%-Konfidenzintervalle für die



Quotienten von Test und Referenz der AUC- und  $C_{\max}$ -Werte im Bereich von 0,80 bis 1,25 liegen (EMA 2001, FDA 2002). Der Nachweis einer therapeutischen Äquivalenz findet bei dieser Vorgehensweise nicht statt.

Generika sind in der Regel preiswerter als das Original und bieten somit ein nicht unerhebliches Potential zu Einsparungen bei den Arzneimittelausgaben. Ihr Einsatz ist in den weitaus meisten Fällen problemlos und erstreckt sich auf fast alle Indikationsgebiete. Es ist jedoch allgemein bekannt, dass bereits kleine Variationen in der Formulierung eines Arzneimittels tief greifende Veränderungen mit zum Teil schwerwiegenden Folgen nach sich ziehen können (Holt 1978, Gilman 1993). Da Generika üblicherweise nicht die selbe Galenik wie das Original besitzen, sind derartige Auswirkungen nicht gänzlich auszuschließen. Diese Problematik fällt insbesondere bei *critical dose drugs* ins Gewicht. Ciclosporin ist, wie auch das Immunsuppressivum Tacrolimus, ein typischer Vertreter dieser Gruppe von Pharmaka (Kahan 1999 a), die sich wie folgt charakterisieren lässt:

schmales therapeutisches Fenster

Notwendigkeit eines Blutspiegel-Monitorings

große inter- und intraindividuelle Variabilität

niedrige, variable Resorption

formulierungsabhängige Bioverfügbarkeit

schwerwiegende Folgen bei Unter- oder Überdosierung

Welche Auswirkungen eine Umstellung der Formulierung bei Ciclosporin haben kann, wurde erstmals bei Einführung der Gelatine kapsel von Sandimmun® deutlich. Obwohl Untersuchungen an gesunden Probanden Bioäquivalenz zur Sandimmun® Lösung nahe legten, war die Pharmakokinetik bei Patienten signifikant verschieden und außerdem nicht vorhersagbar (Kahan 1999 b). Handelte es sich hier noch um verschiedene Darreichungsformen, so ergaben sich auch ausgeprägte Differenzen beim Vergleich der klassischen Sandimmun® Kapseln mit Sandimmun® Optoral Kapseln. Die neue Mikroemulsionsformulierung führte, wie bereits geschildert, zu einer signifikant höheren und konstanteren Bioverfügbarkeit. Gerade für Sandimmun®-Malabsorber bestand bei einer 1:1-Umstellung auf Sandimmun® Optoral die Gefahr einer Überdosierung.

Vor Einführung von Optoral war bereits bekannt, dass sich die Absorption von Ciclosporin durch Reduktion der Tröpfchengröße in der Emulsion verbessern lässt (Tarr und Yalkowsky 1989). Die Relevanz der Galenik verdeutlichte sich auch am ersten Ciclosporin-Generikum auf dem US-Markt. Beim Verdünnen der oralen Lösung mit Apfelsaft resultierte eine markant geringere Bioverfügbarkeit, die den Hersteller schließlich zur Rücknahme des Präparates vom Markt zwang (Henney 2000). Die Pharmakokinetik der Optoral-Lösung wird dagegen weder von Apfel- noch von Orangensaft beeinflusst (Kovarik et al. 2002). In einer retrospektiven Analyse der Daten von über 17.000 Nierentransplantierten offenbarte sich unter der Therapie mit Generika ein deutlicher Trend zu niedrigeren Raten des Transplantatüberlebens im Vergleich zu Optoral (CTS 2001).

Aus den Reihen der Transplantationsmediziner werden zunehmend Forderungen laut, die aktuellen Richtlinien zum Nachweis der Bioäquivalenz bzw. die Zulassungsanforderungen allgemein bei *critical dose drugs* zu verschärfen (Johnston et al. 1997, Kahan 1999 a, Sabatini et al. 1999). Bei einer Umstellung von einem Generikum A mit einer Bioverfügbarkeit an der unteren Bioäquivalenzgrenze (0,80) auf ein Generikum B an der oberen Grenze (1,25) oder umgekehrt, ergibt sich eine eventuell nicht unerhebliche Schwankungsbreite. Johnston und Holt plädieren deshalb für die Verwendung von 95%- statt 90%-Konfidenzintervallen oder engerer Bioäquivalenzgrenzen von 0,9 bis 1,12 (Johnston und Holt 1999), wie dies z.B. bei der kanadischen Zulassungsbehörde Standard ist (McGilveray und Gallicano 1999). Auch die EMA schlägt bei einem Wirkstoff mit einem *narrow therapeutic index* engere

Bioäquivalenzgrenzen vor, ohne sie jedoch verbindlich zu fordern (EMEA 2001). Sabatini et al. plädieren für die Implementierung des Nachweises einer individuellen Bioäquivalenz. Selbst bei nachgewiesener allgemeiner Bioäquivalenz eines Ciclosporin-Generikums ergaben sich in Einzelfällen Unterschiede in der AUC von bis zu 50 % (Schroeder et al. 1998). Ein weiterer Kritikpunkt ist die Durchführung der Bioäquivalenzstudien an jungen, gesunden und zumeist männlichen Probanden. Mögliche Einflüsse von Begleitmedikation, der zugrunde liegenden Krankheit oder begleitenden Therapien bei Patienten können auf diese Weise nicht berücksichtigt werden. Untersuchungen zur Bioäquivalenz aber auch zur Langzeitwirksamkeit und -sicherheit an transplantierten Patienten sollen deshalb eingeführt werden. Christians und Kollegen lehnen dies jedoch ab, da zu hohe Patientenzahlen nötig wären, um ein Minimum an statistischer Aussagekraft zu erreichen. Dies wiederum würde die Kosten der Entwicklung steigern und somit den Generika ihre Marktbasis entziehen (Christians et al. 2000). Zudem sei noch kein Beweis erbracht worden, dass z.B. die Einführung einer individuellen Bioäquivalenz ein eventuell vorhandenes Therapieproblem lösen würde.

### 1.3.9 Einfluss von Ciclosporin auf ausgewählte gefäßtonisierende Mediatoren

#### 1.3.9.1 Prostacyclin und Thromboxan A<sub>2</sub>

Prostaglandine und Thromboxane sind cyclische Eicosanoide. Die Biosynthese erfolgt ausgehend von, in Zellmembranen lokalisierter Arachidonsäure, die unter Katalyse von Cyclooxygenasen zu Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) und Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) verstoffwechselt wird. Aus diesen Vorstufen entstehen unter anderem Prostacyclin und Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>).

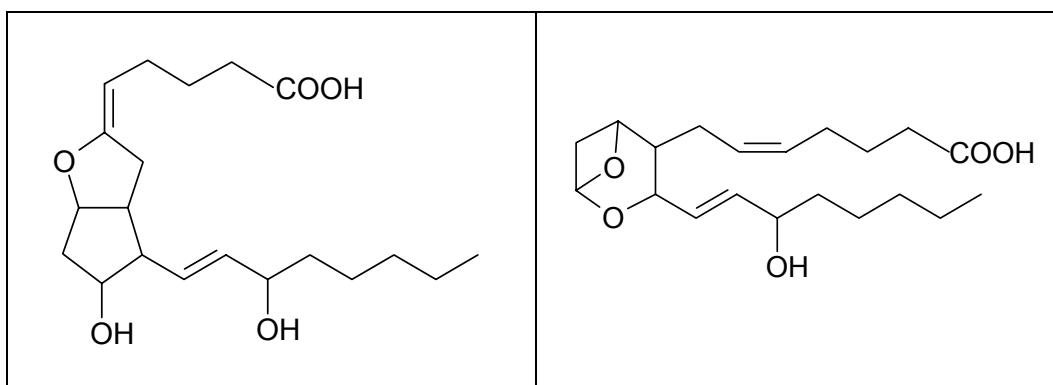


Abbildung 6: Strukturformeln von Prostacyclin (links) und Thromboxan A<sub>2</sub> (rechts).

Prostacyclin wird im Gefäßendothel gebildet und hat eine stark vasodilatierende und thrombozytenaggregationshemmende Wirkung. Es wird in vivo rasch zu 6-keto Prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-keto PGF<sub>1α</sub>) verstoffwechselt. Thromboxan A<sub>2</sub> ist dagegen ein Vasokonstriktor und fördert die Thrombozytenaggregation. Es wird vorwiegend von Thrombozyten, aber auch von renalen Mesangial- und Epithelzellen synthetisiert. Durch Ringöffnung und Bildung eines Diols entsteht das inaktive Thromboxan B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>). Prostacyclin und Thromboxan A<sub>2</sub> sind Gegenspieler.

Die akute Nephrotoxizität stellt, wie bereits geschildert, eine der schwerwiegendsten unerwünschten Wirkungen von Ciclosporin dar. Sie ist wahrscheinlich auf ein Ungleichgewicht vasodilatatorischer und -konstriktorischer Mediatoren, zugunsten letzterer, zurückzuführen (L'Azou et al. 1999, Rodicio 2000, Darlametsos und Varonos 2001). Die Expression der, an der Synthese von Prostaglandinen und Thromboxanen beteiligten Cyclooxygenase-2 (COX-2)

scheint unter anderem über den NFAT-Signalweg stimuliert zu werden (Iniguez et al. 2000, Sugimoto et al. 2001). Ciclosporin greift hemmend in den NFAT-Signalweg ein und ist in der Lage, die COX-2 Genexpression in der Nierenrinde fast vollständig zu unterdrücken (Hoherl et al. 2002). Welche Auswirkungen dieser direkte Eingriff von Ciclosporin in die renalen Funktionsprozesse hat, an denen Prostaglandine wesentlich beteiligt sind, wird aktuell von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht.

#### 1.3.9.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid wird im Organismus aus L-Arginin gebildet. Durch Oxidation des terminalen Guanidino-Stickstoffatoms entstehen über eine Oxim-Vorstufe L-Citrullin und NO. Diese Reaktion wird durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert, wovon mindestens 3 Isoformen existieren.

*Neuronale NOS* (nNOS): Lokalisation vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem; zytoplasmatisch; Calcium/Calmodulin abhängig

*Endotheliale NOS* (eNOS): Lokalisation vor allem in Gefäßendothelzellen; in der Plasmamembran; Calcium/Calmodulin abhängig

*Induzierbare NOS* (iNOS): Vorkommen z.B. in Makrophagen; zytoplasmatisch; durch Cytokin induzierbar; Calcium/Calmodulin unabhängig

NO stimuliert die zytoplasmatische Guanylatcyclase. Diese katalysiert die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). In Abhängigkeit von der Lokalisation und Konzentration des NO ergeben sich verschiedene Wirkungen und Funktionen. Im Nervensystem fungiert es als Neurotransmitter. In sehr hohen Konzentrationen, z.B. bei Sepsis, ist es ein Zellgift. In den Bronchien führt NO zur Bronchodilatation, in den Blutgefäßen zu einer Absenkung des Gefäßtonus sowie der Thrombozytenadhäsion und –aggregation. Der im Endothel gebildete endothelium derived relaxing factor (EDRF) ist mit NO identisch.

Ciclosporin, wie auch Rapamycin, hemmt in vitro signifikant die iNOS Expression auf mRNA Ebene und damit die NO Produktion (Attur et al. 2000). Darüber hinaus wird auch die Bildung von endotheliale NO inhibiert (Oriji 2003). Eine reduzierte Freisetzung von NO ist in die Entstehung der ciclosporinbedingten Nephrotoxizität und Hypertonie involviert (Bennett 1996, Zeier et al. 1998, Oriji 2003). Durch Gabe von Nitraten kann der coronarkonstriktorischen Wirkung von Ciclosporin vorgebeugt werden (Braun-Dullaeus et al. 1999).

## 1.4 Repertoire immunsuppressiver Pharmaka

### 1.4.1 Tacrolimus (FK 506, Prograf®)

Tacrolimus ist ein Makrolid und zählt, wie auch Ciclosporin, zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Die Wirkung beruht auf einer Hemmung der IL-2-Synthese. Tacrolimus bindet in den T-Zellen allerdings nicht an Cyclophilin sondern an das *FK bindende Protein* (FKBP). Die Resorption von Tacrolimus ist unabhängig von Galle. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend biliär. Tacrolimus stellt analog dem Ciclosporin ein typisches critical dose drug dar. Die hohe inter- und intraindividuelle Variabilität in der Bioverfügbarkeit erfordert eine Dosierung nach Blutspiegeln. In den ersten Monaten nach Nierentransplantation liegen die Zielspiegel zwischen 100 und 200 ng/ml, danach bei 50-150 ng/ml. Die Dosierung erfolgt in 12 Stunden Intervallen. Aufgrund des identischen Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren ist bei Tacrolimus mit ähnlichen Nebenwirkungen wie bei Ciclosporin zu rechnen. Beim Vergleich beider Substanzen treten bei Tacrolimus vermehrt neurologische Effekte (Tremor) und Posttransplant-Diabetes-Mellitus (PTDM), bei Ciclosporin dagegen eher ‚kosmetische‘ Nebenwirkungen (Hypertrichose, Gingivahyperplasie) auf. Die Kombination von Calcineurin-Inhibitoren sollte vermieden werden, da keine Steigerung des therapeutischen Effekts zu erreichen ist. Der Schweregrad und die Häufigkeit von Nebenwirkungen nehmen dagegen deutlich zu.

### 1.4.2 Glucocorticoide

Glucocorticoide werden in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet. Sie zählen somit neben den Mineralocorticoiden und den Androgenen zur Gruppe der Nebennierenrinden-Hormone. Die Biosynthese erfolgt ausgehend von Cholesterol über Progesteron, wo sich die Synthesewege der Mineralo- und Glucocorticoide aufteilen. Für die glucocorticoide Wirkung sind mehrere chemische Strukturmerkmale nötig: die Ketogruppe an C-3, die Doppelbindung zwischen C-4 und C-5, die Ketolseitenkette an C-17 und die Hydroxyl- bzw. Ketogruppe an C-11. Die physiologisch wichtigsten Vertreter sind Cortisol und Cortison.

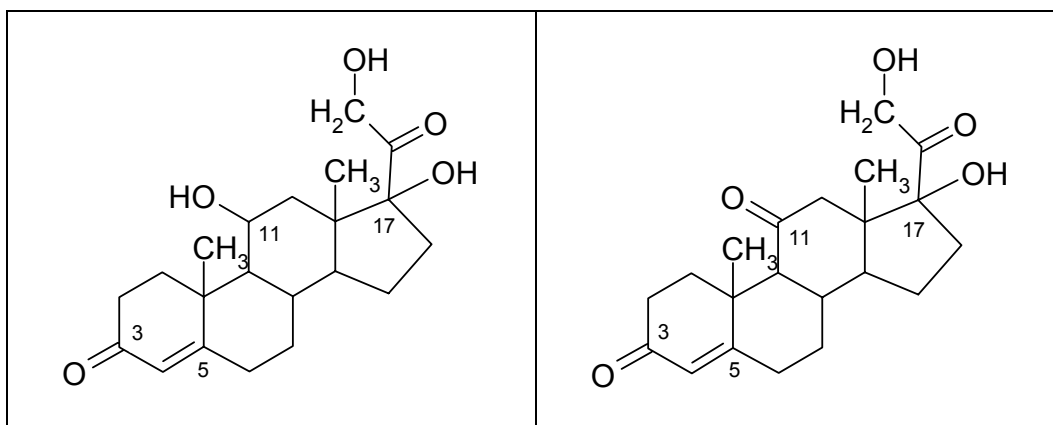


Abbildung 7: Strukturformeln von Cortisol (links) und Cortison (rechts).

Die tägliche Sekretion von Cortisol beim Menschen beträgt ca. 12 - 30 mg. Die Serumkonzentrationen liegen zwischen 50 und 250 ng/ml. Die Cortisolsekretion ist einem circadianen Rhythmus unterworfen, mit Maximalspiegeln morgens gegen 8:00 Uhr und einem Minimum gegen 2:00 Uhr nachts. Die Synthese und die Sekretion der Glucocorticoide wird

durch das hypophysäre Corticotropin (adrenocorticotropes Hormon, ACTH) stimuliert, dessen Freisetzung wiederum durch das hypothalamische Corticoliberin (corticotropin releasing factor, CRF) reguliert wird. Zwischen Hypothalamus, Hypophyse und den zirkulierenden Glucocorticoiden besteht ein negativer Rückkopplungsmechanismus.

Die physiologischen Wirkungen der Glucocorticoide sind vor allem dem Cortisol zuzuschreiben. Es fördert die Gluconeogenese aus Aminosäuren, die durch den Abbau von Proteinen frei werden (katabole Wirkung). Die Blutzuckerspiegel steigen dadurch und es kommt zur vermehrten Speicherung von Glykogen in der Leber. Cortisol beeinflusst auch den Wasser- und Elektrolythaushalt, indem Natriumionen vermehrt retiniert, Kalium- und Calciumionen vermehrt ausgeschieden werden (mineralocorticoide Wirkung). Die lipolytischen Effekte von Catecholaminen werden verstärkt. Hohe Cortisolkonzentrationen, z.B. beim Cushing-Syndrom, führen zur Umverteilung von Fettgewebe, mit Fettverlust in den Extremitäten und Fettzunahme am Körperstamm, Nacken und im Gesicht.

Die therapeutische Bedeutung der Glucocorticoide liegt in ihrer antiphlogistischen, antiallergischen und immunsuppressiven Wirkung. Nach Bindung an den zytoplasmatischen Rezeptor erfolgt die Translokation des Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes in den Nucleus. Die zahlreichen Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung entfalten sich nach Interaktion mit dem glucocorticoid response element. In Makrophagen wird die Gentranskription von IL-1, IL-6 und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) sowie die Exprimierung von MHC gehemmt. In T-Zellen kommt es zu einer verminderten Produktion von IL-2 und zu einer reduzierten Bindungsaffinität an den IL-2 Rezeptor. Als Wirkstoff in der Immunsuppression wird primär Prednisolon eingesetzt, welches aus Cortisol durch Einführung einer Doppelbindung zwischen C-1 und C-2 darstellbar ist. Synthetische Glucocorticoide zeichnen sich allgemein durch eine im Vergleich zu Cortisol verstärkte glucocorticoide und eine abgeschwächte mineralocorticoide Wirkung aus.

Ciclosporin führt im Tierversuch zu einer Erhöhung der Cortisolspiegel (Cufer et al. 1995). Die Ursache scheint eine direkte Stimulierung der Corticotropin-Sekretion durch Ciclosporin zu sein (Sheppard 1995, Cufer et al. 1998). Ob daraus additive oder synergistische immunsuppressive Effekte resultieren ist noch nicht geklärt.

### 1.4.3 Azathioprin (Imurek®)

Azathioprin ist ein *Purin-Antimetabolit* und wird in vivo rasch zu *6-Mercaptopurin* verstoffwechselt. Dieser aktive Metabolit hemmt die Biosynthese von Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP) und damit die Synthese von Purinen und letztlich von DNA und RNA. Daraus resultiert eine reduzierte Proliferation antigenaktivierter T-Lymphozyten. Zu den wichtigsten Nebenwirkungen zählen Myelotoxizität (Neutropenie), gastrointestinale Beschwerden (Nausea, Emesis) und hepatotoxische Effekte. Azathioprin wird in der Prophylaxe akuter Abstoßungen eingesetzt, verliert seit der Einführung von Mycophenolatmofetil aber zunehmend an Bedeutung.

### 1.4.4 Mycophenolsäure

Die, aus *Penicillium*-Pilzen isolierte Mycophenolsäure (MPA) ist als *Mycophenolatmofetil* (MMF, CellCept®) seit 1995 im Handel. Diese Esterverbindung wird im Körper rasch zur Säure abgebaut. MPA bewirkt eine selektive und reversible Hemmung der *Inositolmonophosphat-Dehydrogenase* (IMPDH). Dadurch wird die de novo Synthese von Guanosin-Nukleotiden, die Produktion von Antikörpern und die Proliferation von Lymphozyten unterbunden. Lymphozyten sind auf die de novo Synthese in besonderem Maße angewiesen, da sie im Gegensatz zu anderen Zellen nicht über einen ‚salvage pathway‘ zur Wiederverwertung von Purinen verfügen.

Die Metabolisierung von MPA erfolgt überwiegend in der Leber durch Glucuronidierung zum MPA-Glucuronid (MPAG). Dieses unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf und wird im Darm als MPA rückresorbiert. MPAG spielt somit für das Erreichen von steady-state Konzentrationen eine wichtige Rolle.

MMF ist für die Prophylaxe akuter Abstoßungen in Kombination mit Calcineurin-Inhibitoren zugelassen. Die Dosierung beträgt zweimal täglich 1 g. Zu den vorherrschenden unerwünschten Wirkungen zählen Leukopenien, Sepsis, Emesis, Ösophagitis und Diarrhoen (ca. 50 % der Patienten). Die Entwicklung einer magensaftresistenten Formulierung von *Natriummycophenolat* (**ERL080**) soll vor allem zu einer Reduktion gastrointestinaler Nebenwirkungen führen. ERL080 wird im Dünndarm verzögert freigesetzt, MMF bereits im Magen. Durch die direkte Verfügbarkeit der aktiven Mycophenolsäure erhofft man sich eine, gegenüber MMF verbesserte Pharmakokinetik.

#### **1.4.5 Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®) und Everolimus (SDZ-RAD)**

Sirolimus ist ein Makrolid mit struktureller Ähnlichkeit zu Tacrolimus. Es bindet in T-Zellen analog diesem an das FKBP. Sirolimus blockiert jedoch nicht Calcineurin, sondern bildet einen Komplex mit dem *target of rapamycin* (TOR). Die Inhibierung der Kinase reduziert die IL-2 Rezeptor vermittelte Signaltransduktion. Die T-Zellen werden dadurch in der späten G1 Phase des Zellzyklus arretiert. Neben hämatopoetischen Zellen besitzt Sirolimus auch eine Wirkung auf nichthämatopoetische Zellen.

Sirolimus befindet sich seit 1999 auf dem Markt und wird innerhalb der ersten 2 bis 3 Monate postoperativ in Kombination mit Ciclosporin und Glucocorticoiden angewandt. Eine längerfristige Kombination von Sirolimus und Ciclosporin ist zu vermeiden. Die weitere Gabe von Sirolimus (zusammen mit Glucocorticoiden) in der Erhaltungstherapie ist demnach nur dann möglich, wenn Ciclosporin abgesetzt werden kann. Da die Substanz ebenfalls über CYP-3A und P-glycoprotein verstoffwechselt wird, ist bei gleichzeitiger Gabe mit Ciclosporin eine Verdoppelung der AUC von Sirolimus zu beobachten. Aus diesem Grund soll Sirolimus mit einem zeitlichen Abstand von 4 Stunden nach Gabe von Ciclosporin verabreicht werden. Die tägliche Dosierung beträgt 2 – 5 mg. Durch Applikation einer so genannten loading dose (dreifache Erhaltungsdosis) wird versucht, möglichst frühzeitig steady-state Bedingungen zu erzielen. Bei den Nebenwirkungen stehen Hypercholesterin-, Hypertriglyzeridämie und Thrombozytopenie im Vordergrund. Im Vergleich zu Calcineurin-Inhibitoren besitzt Sirolimus eine geringere nephrotoxische Wirkung.

Everolimus befindet sich derzeit in der Endphase der klinischen Erprobung. Der strukturelle Unterschied zu Sirolimus besteht in einer Hydroxyethylgruppe an C-40. Everolimus ist damit polarer und offenbart eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit. Es ist kein Prodrug, da in vivo lediglich 5 % zu Sirolimus verstoffwechselt werden. Der Wirkmechanismus beider Pharmaka ist identisch. Neben einer Absenkung der Rate akuter Abstoßungen, sind auch eine reduzierte Proliferation glatter Muskelzellen und eine verminderte Rate an CMV-Infektionen zu verzeichnen. Everolimus kann im Gegensatz zu Sirolimus direkt mit Ciclosporin und in langfristiger Kombination mit diesem verabreicht werden. Die gemeinsame Gabe erlaubt eine Dosisreduktion von Optoral wodurch eine Verringerung vor allem der nephrotoxischen Nebenwirkungen von Ciclosporin ermöglicht wird. Die kürzere Halbwertszeit gegenüber Sirolimus vereinfacht die klinische Handhabung. Die Gabe einer loading dose ist bei Everolimus nicht erforderlich.

#### 1.4.6 Weitere Immunsuppressiva

**OKT3** ist ein xenogener monoklonaler Antikörper gegen den CD3-Komplex auf T-Zellen. Die Deaktivierung des CD3-Komplexes führt zur Endozytose des TZR. Damit sind T-Zellen nicht mehr in der Lage, Antigene zu erkennen und zu binden. Aufgrund seines murinen Ursprungs kann OKT3 anaphylaktische Reaktionen auslösen. Weitere, zum Teil lebensbedrohliche Nebenwirkungen sind Lungenödeme, Hypotonie und die so genannte Erstdosis-Reaktion, mit Fieber, Nausea, Emesis und Diarrhoe. OKT3 findet in der Therapie steroidresistenter Abstoßungen Verwendung, spielt wegen der schwerwiegenden Nebenwirkungen heute aber eine untergeordnete Rolle.

In dieser Indikation kommen vermehrt polyklonale Immunglobuline zum Einsatz. Dazu zählen das, aus Pferden stammende **Atgam** und das von Kaninchen gewonnene **Thymoglobulin**. Beide wirken gegen eine Reihe von Leukozytenantigenen und führen unter anderem zu einer Hemmung der T-Zell-Aktivität. Die Therapie einer steroidresistenten Abstoßung mit polyklonalen Antikörpern erstreckt sich in der Regel über 7 – 14 Tage. Limitierend auf die Anwendung wirkt sich die Entwicklung von Thrombozytopenien, Neutropenien und Glomerulonephritis aus. Die wiederholte Therapie soll wegen der Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion unterbleiben.

**Basiliximab** (Simulect®) und **Daclizumab** (Zenapax®) sind monoklonale Antikörper gegen die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25 / Tac). Nach Bindung der Antikörper werden IL-2 vermittelte Reaktionen in aktivierten T-Zellen unterbunden. Durch gentechnische Veränderung dieser ursprünglich murinen Antikörper ist der xenogene Anteil stark zurück gedrängt, was sich in einer sehr geringen Nebenwirkungsrate und einer langen Halbwertszeit niederschlägt. Basiliximab und Daclizumab werden in der Initialtherapie zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen eingesetzt. Simulect® wird direkt präoperativ und am 4. Tag nach Transplantation intravenös verabreicht. Der therapeutische Effekt hält ca. 30 Tage an. Zenapax® wird auf 5 Dosen verteilt präoperativ und anschließend in Intervallen von 2 Wochen injiziert. Hier erstreckt sich die Wirkung auf bis zu 12 Wochen.

### 1.5 Neue Wege in der Immunsuppression

Das grundlegende, aus der Anwendung immunsuppressiver Pharmaka resultierende Problem ist das erhöhte Risiko an Infektionen und malignen Erkrankungen. Darüber hinaus beeinträchtigen die zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen dieser Wirkstoffklasse den therapeutischen Erfolg. Ebenso ist das chronische Transplantatversagen ein bis heute ungelöstes Problem. Es gilt demnach, neue, effektive und zugleich sichere Alternativen zu entwickeln.

Einen völlig neuartigen Wirkmechanismus zeigt das, derzeit in der klinischen Phase II befindliche **FTY720**. Die Substanz verhindert die Infiltration von Lymphozyten in das transplantierte Organ, ohne dabei die zelluläre oder humorale Abwehrreaktion zu beeinträchtigen. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht gänzlich bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass FTY720 über eine Modifikation der Chemokinrezeptoren auf Lymphozyten deren Sensibilität gegenüber so genannten Homing Chemokinen reversibel erhöht. Die Lymphozyten wandern dadurch zurück in die lymphatischen Organe, bei gleichzeitig sinkender Anzahl im Blut. Die Menge zirkulierender Monozyten und Granulozyten wird nicht beeinflusst. Im Tiermodell bot FTY720 zudem einen Schutz gegen Reperfusionsschäden im transplantierten Organ. FTY720 besitzt eine lange Halbwertszeit von etwa 9 Tagen und wird deshalb einmal täglich appliziert. Die Pharmakokinetik weist eine allenfalls geringe interindividuelle Variabilität

auf. Als Nebenwirkung wurde bisher unter anderem eine milde, reversible Bradykardie beobachtet.

Einen Weg abseits der klassischen Immunsuppression beschreitet die Immunmodulation. Dabei wird versucht, im Transplantatempfänger eine **Immuntoleranz** gegen Spenderantigene zu erzeugen. Unter initialer Immunsuppression wird der Empfänger einer mehrmaligen Bestrahlung unterzogen. Anschließend werden diesem Blutstammzellen des Spenders injiziert. In einer Studie an vier ‚HLA-mismatched‘ Nierentransplantationspatienten konnte Chimärismus, ohne Auftreten von graft-versus-host-disease (GvHD) erzielt werden (Millan et al. 2002). Nach 12 Monaten war es möglich, bei einem Patienten die immunsuppressive Therapie vollständig abzusetzen. Sollten sich diese ersten Ergebnisse an großen Patientenkollektiven bestätigen lassen, so ist mit einem immensen Fortschritt in der Transplantationsmedizin zu rechnen (Danovitch 2001, Neumayer 2001).



## 2. Problemstellung

Unter Zugrundelegung der komplexen, formulierungsabhängigen Pharmakokinetik von Ciclosporin und der stetig steigenden Zahl von, auf den Markt drängenden Nachahmerprodukten sollten verschiedene Generika auf ihr pharmakokinetisches Verhalten untersucht und zum Teil direkt mit dem Originalprodukt Sandimmun® Optoral (Novartis) verglichen werden.

In einer ersten Versuchsreihe galt es, in vitro die Resorption von Ciclosporin aus Gengraf™ (Abbott), Cyclosporine Capsules (EonLabs) und Optoral am isolierten Rattenileum zu untersuchen. Hierbei wurde auf die physiko-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Formulierung mit Blick auf die Adhäsion bzw. Adsorption von Ciclosporin an Oberflächen besonders eingegangen.

Weiterhin erfolgte an WKY-Ratten die Untersuchung des Einflusses einer mehrtägigen Applikation von Olivenöl in Verbindung mit der Cyclosporingabe auf die Bioverfügbarkeit und Metabolisierung des Wirkstoffs unter steady-state Bedingungen. Dazu wurden Cyclosporine Capsules und Optoral gegeneinander getestet.

In einer Pilotstudie an gesunden Probanden wurde die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus den beiden Generika Cyclosporine Capsules und Cicloral® (Hexal) verglichen, sowie Auswirkungen auf die Cortisolspiegel, den Blutdruck und die Herzfrequenz untersucht.

Abschließend wurde an gesunden Probanden eine Kinetikstudie zur Bestimmung des Einflusses von fettreicher Nahrung auf die Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Ciclosporin aus Cicloral® durchgeführt. Dabei wurden außerdem Effekte von Ciclosporin auf den Glucocorticoidhaushalt sowie auf vasokonstriktorische und -dilatatorische Mediatoren untersucht.

### 3. Probanden, Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Acetonitril zur Chromatographie	J.T. Baker, Groß-Gerau
Calciumchlorid-Dihydrat	E. Merck, Darmstadt
ClinRep® Komplettkit ‘Ciclosporin und Metaboliten	Fa. Recipe, München
CsA Metaboliten AM1, AM1c, AM9, AM4N	Fa. Novartis, Nürnberg
Cyclosporin D	Fa. Recipe, München
D-(+)-Glucose-Monohydrat	E. Merck, Darmstadt
Dichlormethan	E. Merck, Darmstadt
EGTA	E. Merck, Darmstadt
Isotonische Kochsalzlösung	B. Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,5)	
Magnesiumsulfat Heptahydrat	E. Merck, Darmstadt
Methanol zur Chromatographie	J.T. Baker, Groß-Gerau
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	E. Merck, Darmstadt
Natriumsulfat wasserfrei	E. Merck, Darmstadt
Wasser gereinigt, MilliQ 4fach Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Neu-Isenburg

#### 3.2 Pharmaka

Carbogen (95 % O <sub>2</sub> / 5 % CO <sub>2</sub> )	Fa. Linde, Höllriegelskreuth
Cicloral® 100 mg Kapseln	Fa. Hexal, Holzkirchen
Cicloral® Lösung 100 mg/ml	Fa. Hexal, Holzkirchen
Cortisol, mind. 98 % (Hydrocortisone, MW 362,5)	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cortisone, mind. 98 % (MW 360,4)	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cyclosporine Capsules (USP modified) 100 mg	Fa. EonLabs, Laurelton, USA
Elektrolyt-Infusion E153, 500 ml	Fa. Serumwerk Bernburg, Bernburg
Gengraf™ Cyclosporine Capsules, USP (modified) 100 mg	Fa. Abbott Laboratories, North Chicago, USA
Kodan® Tinktur forte	Fa. Schülke&Mayr, Norderstedt
Liquemin® N20000, 1 ml Ampulle (Heparin-Na)	Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen
6α-Methylprednisolon, mind. 98 %	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sandimmun® 100 mg Kapseln	Fa. Novartis, Nürnberg
Sandimmun® Optoral 100 mg Kapseln	Fa. Novartis, Nürnberg
Sandimmun® Optoral Lösung 100 mg/ml	Fa. Novartis, Nürnberg
Sauerstoff für medizinische Zwecke	Klinikum d Universität Regensburg
Sevorane® (Sevofluran)	Fa. Abbott, Wiesbaden

### 3.3 Geräte und Instrumente

Absaugtopf		Fa. Machery-Nagel, Düren
Analysenwaagen	Typ H 51 handy Typ 1202 MP	Fa. Sartorius, Göttingen Fa. Quelle, Fürth
Beatmungspumpe für Kleintiere		Fa. Rhema
Butterfly	Surflo 21G	Fa. Teruno, Leuven, Belgien
Colorimetric Assay Kits	Nitrate / Nitrite	Fa. Cayman, Ann Arbor, USA
Combi-Stopper		Fa. Braun, Melsungen
Connecta Plus 3		Fa. B&D, Hamburg
EIA Kits	6-keto Prostaglandin F <sub>1α</sub> Thromboxane B <sub>2</sub>	Fa. Cayman, Ann Arbor, USA Fa. Cayman, Ann Arbor, USA
EKG	Marquette MAC 500	Fa. VMA, Abensberg
Homogenisatoren	Ultra Turrax, Typ 18-10	Fa. Janke&Kunkel, Breisgau
Kältetruhen	Revco Ultima 1090-5VUB Privileg 031.352 8	Fa. Pabisch, München
Kanülen	Sterican, versch. Größen Vasofix® Braunüle	Fa. Braun, Melsungen
Kühlschrank	FKS 3600	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	Ika Combimag RCT	Fa. Janke&Kunkel, Breisgau
Monovetten®	EDTA-, Li-Heparin-	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Multi-Adapter		Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Narkosegerät	Trajan 808	Fa. Dräger
Ölpumpe	Alcatel 350 C	Fa. Elnor, Wespelaar, Belgien
Operationsbesteck		Fa. Martin, Tuttlingen
Perfusor Spritze		Fa. Braun, Melsungen
Pflaster	Cutiplast steril	Fa. Beiersdorf, Hamburg
pH-Meter		Fa. Knick
Pipettenspitzen		Fa. Abimed, Düsseldorf
Plate reader	MRX Revelation 4.02	Fa. Dynex, Denkendorf
PPN Röhrchen	4,5 ml	Fa. Greiner, Nürtingen
Schlundsonde	Animal Feeding Needle, 75x1.5mm	Fa. TSE, Kronberg
Schüttelwasserbad	Typ CS 20	Fa. MGW Lauda
Spektralphotometer	LKB Biochrom	Fa. Novaspec
Spritzen	2,5; 10 ml	Fa. Braun, Melsungen
Überkopfschüttler	REAX 2	Fa. Heidolph, Kelheim
Urinsammelgefäß	Urilab-Flaschen	
Vakuumzentrifuge	Vakuum Zentrifugal Verdampfer RC 10.22	Fa. Jouan, Unterhaching
Vortexgerät	REAX 2000	Fa. Heidolph, Kelheim
Zentrifugen	Minifuge II Typ 4123 Centrifuge 5403 Megafuge 1.0R	Fa. Heraeus, Osterode Fa. Eppendorf Fa. Heraeus, Osterode
<b>3.3.1.1 HPLC</b>		
Autosampler	SIL 10A	Fa. Shimadzu, Duisburg
Detektor	SPD 10AV	Fa. Shimadzu, Duisburg
Drucker	NEC Pinwriter P6 plus	Fa. NEC, München
Integrator	Class LC10	Fa. Shimadzu, Duisburg
Pumpe	LC-10 AT	Fa. Shimadzu, Duisburg
Säulen	Luna 5u Phenylhexyl, 150 x 4,6 mm Synergi Polar RP, 150 x 4,6 mm	Fa. Phenomenex, Aschaffenburg
Säulenofen	ERC 125	Fa. ERC, Rheinbach

### 3.4 Versuchstiere

Für die experimentellen Tierversuche wurden ausschließlich männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) verwendet.

Normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY)

Nach Selektionierung des Wistar-Stammes zu Beginn des letzten Jahrhunderts im Wistar-Institut in den USA wurden diese Tiere als Inzuchtstamm im Glaxo-Laboratorium weitergeführt. Nach Hysterektomie 1974 bei den Charles-River-Werken in den USA gelangten diese Tiere 1986 zur Charles-River GmbH in Sulzfeld. Dieser Rattenstamm wird als hämodynamisch physiologisches Versuchstier verwendet.

### 3.5 Tierhaltung

Die Ratten im Alter von ca. neun Wochen wurden über Charles-River, Sulzfeld, bezogen. Die Haltung erfolgte paarweise in speziellen Käfigen (42 x 26 x 18 cm) auf Altromin® Tiereinstreu Fasern. Dieses wurde, im Zuge der Käfigreinigung, zweimal wöchentlich gewechselt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Als Standardfutter diente Altromin® Pellet Diät für Ratten und Mäuse. Die Bedingungen im Tierstall wurden auf folgende, für Nager optimale Parameter eingestellt:

Temperatur:	23 °C ± 2 °C
Relative Luftfeuchtigkeit:	55 % ± 5 %
Hell-Dunkel-Intervall:	12 h

Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere über einen Zeitraum von fünf Tagen an die lokalen Bedingungen adaptiert. Am Vorabend der jeweiligen Versuche gegen 19:00 Uhr wurde den Tieren das Futter entzogen, um möglichst vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten. Die Tötung der Ratten nach Abschluss der Versuche erfolgte durch Dekapitation nach vorangegangener Inhalationsnarkose mit Sevofluran.

### 3.6 In vitro Untersuchung zur Resorption von Ciclosporin am isolierten Rattenileum

#### 3.6.1 Versuchsziel

Die Zielsetzung des Versuchs lag in der Bestimmung der Resorption von Ciclosporin aus einer wässrigen Donorlösung durch isoliertes Rattenileum in eine stationäre wässrige Akzeptorlösung.

#### 3.6.2 Testpräparate

Cyclosporine Capsules, USP (modified) 100 mg, Fa. Eon Labs (EON)

Gengraf™ Cyclosporine Capsules, USP (modified) 100 mg, Fa. Abbott Labs (GEN)

Sandimmun® Optoral Kapseln 100 mg, Fa. Novartis (OPT)

Zur Herstellung einer Ciclosporin-Stammlösung wurde in einem Erlenmeyerkolben jeweils eine Kapsel mit 100 mg Ciclosporin in 20 ml Wasser dispergiert, woraus eine Konzentration von 5 mg/ml resultierte. Diese Lösung wurde am Morgen eines jeden Versuchstages frisch hergestellt.

### **3.6.3 Organbad**

Als Organbad diente jeweils ein (insgesamt zwei) schmales, doppelwandiges Glasgefäß (Innendurchmesser: 2,5 cm, Tiefe: 12 cm), welches von der Glasbläserei der Universität Regensburg hergestellt worden war. Dieses wurde mit 35 ml Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,5) als Donormedium befüllt und mit Hilfe eines Wasserbads auf 37 °C temperiert. Zur Kontrolle der Einhaltung einer konstanten Temperatur war im Organbad ein Thermometer befestigt. Eine gleichmäßige Durchmischung der Donorlösung wurde per Magnetrührer und Rührfisch erzeugt. Während des Versuchs wurde die Donorlösung permanent mit Carbogen begast, welches mit konstantem Druck durch eine Fritte am unteren Ende eines Glasrohres eingeleitet wurde. Dieses Glasrohr war mit zwei Haken versehen und diente als Befestigung für das isolierte Ileum.

Nach Beendigung eines Versuchs wurde das Organbad über Nacht mit Methanol-Wasser 70:30 (v/v) befüllt, um eventuell an die Wandung adsorbiertes Ciclosporin zu entfernen.

### **3.6.4 Isolierung des Ileums**

Zur Isolierung des Ileums wurden die Ratten nach Inhalationsnarkose mit Sevofluran auf einem OP-Tisch für Kleintiere fixiert und mittels einer Beatmungspumpe mit einem Luft-Sauerstoff-Sevofluran-Gemisch beatmet. Der Beatmungsschlauch wurde an der Schnauze der Tiere aufgesetzt und mit einem Gummi an den oberen Vorderzähnen arretiert. Der Bauchraum der Ratten wurde eröffnet und ca. 20 cm des Ileums entnommen. Der, dem Coecum nächstgelegene Abschnitt von 5 cm Länge wurde dabei nicht berücksichtigt. Das Ileum wurde sofort nach Entnahme in eisgekühlte Ringerlactat-Lösung getaucht. Für die einzelnen Versuche kam jeweils ein Teilstück Ileum von 7 cm Länge zur Verwendung. Je Ratte wurden zwei Stücke Ileum gewonnen, die zeitlich parallel in den beiden Organbädern untersucht wurden. Die Entfernung von Faecesresten aus dem Darmlumen erfolgte durch vorsichtiges Herausstreichen mit einem handelsüblichen Wattestäbchen, wobei besonderes Augenmerk darauf gelegt wurde, das Darmgewebe nicht zu verletzen. Anschließend wurde das gereinigte Ileum entsprechend der Methode nach Wilson (Wilson und Wiseman 1954) mit einem dünnen Stahlstab (D = 1,5 mm) umgestülpt, so dass die mukosale Seite nach außen gewandt war. Nach Abbinden des unteren Darmendes mit einem Faden, wurden von oben 800 µl Krebs-Henseleit-Puffer als Akzeptorlösung mit einer Spritze in das Lumen eingefüllt und das obere Ende ebenfalls mit einem Faden abgebunden. Das derart präparierte Ileum wurde an einem Glasrohr, durch welches auch das Carbogen eingeleitet wurde, befestigt und in das temperierte Organbad eingehängt. Unmittelbar danach wurde dem Donormedium 1 ml der zu analysierenden Ciclosporin-Stammlösung (5 mg/ml) zugesetzt, entsprechend einer Ausgangskonzentration von 139 µg/ml. Der Versuch wurde jeweils zu den vorgegebenen Zeitpunkten 0,5; 1; 2; und 4 h beendet. Die Proben von Ileum, Donor- und Akzeptormedium wurden bis zur Analyse mittels HPLC bei -70 °C gelagert.

### **3.7 Adsorption von Ciclosporin aus gelösten Kapseln an Glasoberflächen**

#### **3.7.1 Versuchsziel**

Ziel dieses Versuchs war die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Adsorption von Ciclosporin aus zuvor in Wasser gelösten Kapseln an die Glasoberflächen des, bei obigem Versuch (Punkt 3.6) benutzten Organbades.

#### **3.7.2 Testpräparate**

Cicloral<sup>®</sup> Kapseln 100 mg, Fa. Hexal (CIC)

Cyclosporine Capsules, USP (modified) 100 mg, Fa. Eon Labs (EON)

Sandimmun<sup>®</sup> Kapseln 100 mg, Fa. Novartis (SIM)

Sandimmun<sup>®</sup> Optoral Kapseln 100 mg, Fa. Novartis (OPT)

Zur Herstellung einer Ciclosporin-Stammlösung wurde in einem Erlenmeyerkolben jeweils eine Kapsel mit 100 mg Ciclosporin in 20 ml Wasser dispergiert, woraus eine Konzentration von 5 mg/ml resultierte. Diese Lösung wurde unmittelbar vor jedem Versuch frisch hergestellt, um eine Adsorption von Ciclosporin an die Glaswand des Erlenmeyerkolbens möglichst zu unterbinden.

#### **3.7.3 Versuchsdurchführung**

Die Durchführung dieses Versuchs erfolgte analog der Studie am isolierten Rattenileum (siehe Punkt 3.6.3). In Kürze: ein doppelwandiges Glasgefäß wurde mit 35 ml Krebs-Henseleit-Puffer befüllt, dieser kontinuierlich durchmischt und auf 37 °C temperiert. In die Pufferlösung wurde ein Glasrohr eingebracht, durch welches Carbogen eingeleitet wurde. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h wurde 1 ml der Ciclosporin-Stammlösung zugegeben, entsprechend einer Ausgangskonzentration von 139 µg/ml. Zu den Zeitpunkten 0,5; 1; 2; und 4 h wurde jeweils 1 ml der Ciclosporin-Dispersion entnommen und bis zur Analyse mittels HPLC bei -70 °C aufbewahrt. Auch dieser Versuch wurde als Doppelansatz in den beiden Mantelgefäßen durchgeführt.

### **3.8 Adsorption von Ciclosporin aus Ciclosporin-Lösungen an Glasoberflächen**

#### **3.8.1 Versuchsziel**

Ziel dieses Versuchs war die Bestimmung der Wiederfindung von Ciclosporin aus einer Ciclosporin-Lösung in einem Trinkglas und damit die indirekte Bestimmung der Adsorption von Ciclosporin an Glas.

#### **3.8.2 Testpräparate**

Cicloral<sup>®</sup> Lösung 100 mg/ml, Fa. Hexal (CIC-L)

Sandimmun<sup>®</sup> Optoral Lösung 100 mg/ml, Fa. Novartis (OPT-L)

### **3.8.3 Versuchsdurchführung**

Der komplette Versuch ließ sich an einem Tag durchführen. Da ein interindividueller Vergleich der beiden Ciclosporin-Lösungen vorgesehen war, wurde parallel immer eine gleiche Anzahl von Ansätzen mit CIC-L und OPT-L begonnen.

Als Glasgefäße kamen handelsübliche Trinkgläser der Fa. Ikea mit einem Fassungsvermögen von ca. 250 ml zum Einsatz. Nach Befüllen der Gläser mit 69 ml Leitungswasser wurde jeweils 1 ml der Ciclosporin-Lösung zugegeben. Die Ausgangskonzentration betrug somit 1,43 mg/ml. Einmaliges Schwenken eines jeden Glases direkt im Anschluss diente der gleichmäßigen Verteilung der Ciclosporin-Lösung im Gefäß. Die Gläser verblieben sodann bei Raumtemperatur in Ruhe. Für jeden der geplanten Messzeitpunkte ( $t = 0$  h; 0,5 h; 1 h und 2 h) wurden eigene Ansätze verwendet. Zu diesen Zeitpunkten wurde nach abermaligem Schwenken des Glases jeweils 1 ml Probe entnommen und der Versuch beendet. Die Proben wurden 1:100 in Eluent (MeCN/H<sub>2</sub>O/MeOH-200/140/20 (v/v/v)) verdünnt und ohne weitere Aufbereitung in die HPLC-Apparatur injiziert.

## **3.9 Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus, in Wasser bzw. Olivenöl gelösten Cyclosporine Capsules (EonLabs) und Sandimmun<sup>®</sup> Optoral Kapseln (Novartis) bei Ratten unter steady-state Bedingungen**

### **3.9.1 Vorversuch: Bestimmung des Zeitraums bis zum Erreichen von steady-state Bedingungen**

An insgesamt zwölf männlichen WKY-Ratten wurde der Zeitraum bis zum Erreichen von steady-state Bedingungen im Vollblut und Nierencortex nach peroraler Applikation der gelösten Ciclosporin-Kapseln mittels Schlundsonde untersucht.

#### **Dosierung**

Analog obiger Versuche wurde durch Dispersion jeweils einer Kapsel Sandimmun<sup>®</sup> Optoral (100 mg Ciclosporin) in 20 ml Wasser eine Ciclosporin-Stammlösung ( $c = 5$  mg/ml) täglich frisch hergestellt. Die Dosierung orientierte sich am Körpergewicht der Ratten und betrug 10 mg/kg/d. Einem ca. 300 mg schweren Tier wurden somit 0,6 ml der Ciclosporin-Stammlösung per Schlundsonde appliziert. Die Verabreichung der Medikation erfolgte in 24h-Intervallen, üblicherweise morgens gegen 8:30 Uhr, nachdem die Tiere zuvor gewogen wurden. Durch Gabe eines entsprechenden Volumens Wasser an den ersten beiden Tagen wurden die Tiere an die Prozedur des Schlundens gewöhnt.

#### **Durchführung**

Das Rattenkollektiv wurde in vier Gruppen zu je drei Tieren eingeteilt. Alle Gruppen erhielten am gleichen Tag (d 0) ihre erste Dosis. Nach einem, drei, fünf und sieben Tagen der Ciclosporin-Gabe wurde die jeweilige Gruppe dekapitiert und Blut- und Nierencortexproben gewonnen. Die Nieren wurden nach Entnahme mit isotoner Kochsalzlösung gespült, um anschließend das Cortexgewebe zu isolieren. Alle Proben wurden umgehend nach Gewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei  $-70$  °C aufbewahrt.

### 3.9.2 Hauptversuch: Zielsetzung

Anhand dieses Versuchs sollte der Einfluss von Nahrung unter besonderer Berücksichtigung des Fettgehalts auf die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin an Ratten untersucht werden. Zur Simulierung einer fettarmen im Vergleich zu einer fettreichen Ernährung wurden die Kapseln der beiden Testpräparate (EON und OPT) zum einen in Wasser, zum anderen in Olivenöl gelöst und den Tieren per Schlundsonde appliziert.

### 3.9.3 Durchführung

Entsprechend den beiden, in zwei verschiedenen Medien (Wasser und Öl) dispergierten Präparaten, wurden jeweils acht Ratten den vier Gruppen EON-w, EON-öl, OPT-w und OPT-öl zugeteilt. Basierend auf den Erkenntnissen des Vorversuchs wurde den Ratten über fünf Tage hinweg, täglich in 24h-Intervallen, Ciclosporin-Stammlösung mit einer Dosierung von 10 mg/kg/d per Schlundsonde appliziert. Die Herstellung der Stammlösung, sowie das Adaptieren der Tiere an das Schlunden erfolgte analog Vorversuch.

Die ersten beiden Tiere einer jeden Gruppe wurden zur Ermittlung des Talspiegels ( $C_0$ ) herangezogen, die letzten beiden für den Spiegel nach 24h ( $C_{24}$ ). Die Tiere 3-6 wurden einer Kurzkinetik unterzogen, mit Bestimmung der Blutkonzentration zu den Zeitpunkten  $C_1$ ,  $C_2$  und  $C_4$ . In Tabelle 3 ist der zeitliche Ablauf des Behandlungsschemas am Beispiel der Gruppe 1 (EON-w) dargestellt.

*Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf der Behandlung von WKY-Ratten mit, in Wasser bzw. Olivenöl gelösten Cyclosporine Capsules (EON) und Sandimmun® Optoral Kapseln am Beispiel der Gruppe 1 (EON-w). X = tägliche Applikation von 10 mg/kg/d Ciclosporin per Schlundsonde*

Gruppe 1	d 1	d 2	d 3	d 4	d 5	d 6	d 7	d 8	d 9
Tiere 1, 2	X	X	X	X	X	C-0h			
Tiere 3, 4		X	X	X	X	X	Kinetik		
Tiere 5, 6			X	X	X	X	X	Kinetik	
Tiere 7, 8				X	X	X	X	X	C-24h

### 3.9.4 Kurzkinetik

Zur Vorbereitung auf den Eingriff wurden die Ratten mit Sevofluran per Inhalation narkotisiert und auf einem beheizbaren OP-Tisch für Kleintiere dorsal fixiert. Die weitere Beatmung erfolgte über die Schnauze mit einer Beatmungspumpe für Kleintiere. An einer Hinterpfote wurde ein venöser Zugang gelegt. Über diesen erfolgte kontinuierliche Elektrolyt-Infusion mittels Perfusor (1 ml/h) zur Volumensubstitution und Kreislaufstabilisierung. Die Körpertemperatur wurde während der Kinetik rektal kontrolliert und über die Heizfunktion des OP-Tischs justiert. Nach Eröffnung des Halsbereichs wurde in stumpfer Präparation die Trachea sowie die Arteria carotis freigelegt. Eine optimierte Beatmung der Tiere über den Zeitraum von vier Stunden wurde durch Tracheotomie erreicht. Hierzu wurde zwischen die hyalinen Knorpelspangen (Cartilagine tracheales) der Trachea hindurch eine Kanüle (16G) platziert, an die der Beatmungsschlauch angeschlossen wurde. Die Kanüle wurde mit einem Faden fixiert, um ein späteres Herausgleiten zu verhindern. Anschließend wurde die Arteria carotis knapp oberhalb der geplanten Punktionsstelle mit einem Faden abgebunden, wobei darauf geachtet wurde, nicht auch den Nervus vagus mit abzubinden. Ein etwas weiter unterhalb positioniertes Stück Faden diente im weiteren Verlauf der Fixierung der Kanüle (26G) für den zentralen Zugang. Diese wurde vorsichtig direkt unterhalb der Ligatur gelegt und über einen Dreivegehahn an ein zentrales



Blutdruckmessgerät gekoppelt. Mit dieser Anordnung konnte sowohl die Überwachung des Blutdrucks wie auch die Blutentnahme durchgeführt werden. An diesem Punkt konnte die zweite Ratte narkotisiert und der gleichen Prozedur unterzogen werden.

Das Sammeln von jeweils ca. 0,7 ml Blut in EGTA-dotierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) zu den Zeitpunkten 1h, 2h und 4h erfolgte über den Dreiwegehahn. Das entnommene Volumen wurde unmittelbar danach über den zentralen Zugang mit isotoner Kochsalzlösung substituiert. Nach Beendigung der Kinetik zum Zeitpunkt 4h wurden die Tiere dekapitiert. Nieren, Leber und Ileum wurden entnommen, mit isotoner Kochsalzlösung gespült und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **3.9.5 Pharmakokinetische Berechnung**

Die pharmakokinetischen Parameter wurden modell-unabhängig individuell aus den Blutkonzentrationen ermittelt. Die maximalen Blutkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) und der zugehörige Zeitpunkt ( $t_{\max}$ ) wurden direkt aus den gemessenen Werten abgelesen. Die Berechnung der Fläche unter der Blutkonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) erfolgte mittels Trapezregel-Integration vom Zeitpunkt t-0 h bis t-4h.

## **3.10 Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cicloral<sup>®</sup> bei gesunden Probanden – Einnahme nach fettreichem Frühstück vs. Nüchternapplikation**

Studiencode: CIC-BV-1

### **3.10.1 Studienziel**

Primäres Studienziel

Ziel der Studie war die Bestimmung der relativen Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup> 100 mg bei oraler Gabe nach fettreichem Frühstück im Vergleich zur Nüchterneinnahme.

Zielparameter waren die Bestimmung des Ausmaßes der Bioverfügbarkeit gemessen an der Fläche unter der Blut-Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) und der Geschwindigkeit des Anflutens des Wirkstoffs im Blut, gemessen an den Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) und dem Zeitpunkt von  $C_{\max}$  ( $t_{\max}$ ).

Sekundäre Studienziele

Als weitere pharmakokinetische Kenngröße wurde die Eliminationshalbwertszeit  $t_{1/2}$  ermittelt. Vor Studienbeginn und nach deren Ende wurden klinisch-chemische Parameter bestimmt, während der Studie „Unerwünschte Ereignisse“ erfasst.

Darüber hinaus sollten folgende Parameter analysiert werden:

Ciclosporin-Metaboliten AM1, AM1c, AM9 und AM4N im Vollblut

Ciclosporin und die Metaboliten AM1, AM1c, AM9 und AM4N im Urin

Cortisol- und Cortisonspiegel im Plasma

Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO) im Urin

### **3.10.2 Studienplan**

#### Studiendesign

Es handelte sich um eine offene, monozentrische, zweifache Cross-over-Untersuchung mit randomisierter Zuteilung des Behandlungsschemas.

#### Zeitliche Durchführung

Die Studie wurde am Lehrstuhl für Pharmakologie der Universität Regensburg von Dezember 2002 bis Januar 2003 durchgeführt.

#### Ethik

Die Prüfung wurde in Übereinstimmung mit §§ 40, 41 AMG über den Schutz des Menschen bei der klinischen Prüfung und gemäß den Empfehlungen der Deklaration von Helsinki (zuletzt geändert in Edinburgh, Schottland, Oktober 2000) durchgeführt.

Die Prüfunterlagen wurden vor Beginn des klinischen Teils der Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg vorgelegt. Das Votum war positiv.

### **3.10.3 Probandenpopulation**

Es wurden 16 Probanden dem Screening-Verfahren unterzogen, von denen zwölf in die Studie aufgenommen wurden.

Die Auswahl der Probanden erfolgte anhand von Ein- und Ausschlusskriterien.

#### Einschlusskriterien

##### männlich

- 18 – 45 Jahre
- schriftliche Einverständniserklärung der Probanden
- Gewicht innerhalb des vorgegebenen Bereichs von Größe –  $100\text{ cm} \pm 20\%$
- Fehlen klinisch signifikanter Befunde bei der Baseline-Untersuchung

#### Ausschlusskriterien

- Teilnahme an klinischen Studien innerhalb eines Zeitraumes von vier Wochen vor Verabreichung der Studienmedikation
- Regelmäßige Einnahme von Medikamenten, die Enzyminduktion oder Enzyminhibition bewirken, innerhalb von vier Wochen vor Studienbeginn
- Blutspende oder ähnlicher Blutverlust innerhalb von zwei Monaten vor Studienbeginn
- Anamnestisch bekannte Überempfindlichkeit gegen das Prüfpräparat oder Wirkstoffe mit ähnlicher chemischer Struktur
- Dauermedikation, welche die Pharmakokinetik der Prüfmedikation beeinflussen könnte (Antazida, CYP<sub>3A4</sub>-Hemmstoffe oder –Induktoren)
- Klinisch relevant von der Norm abweichende Laborwerte
- Gastrointestinale Störungen, welche die Resorption beeinträchtigen könnten
- Spezielle Diät (z.B. strenge Vegetarier)
- Medikamenten-, Drogen-, Nikotin- oder Alkoholmissbrauch in der Vorgeschichte
- Probanden, denen die Möglichkeit fehlt, in ständigem Kontakt mit dem Prüfarzt zu stehen
- Unzureichende Kooperation mit dem Prüfarzt (z.B. Verdacht auf Non-Compliance)
- Vorliegen eines geistigen Zustandes, der es dem Betreffenden nicht möglich macht, das Wesen der Prüfung, deren Tragweite und mögliche Folgen zu verstehen
- HIV positiv
- Hepatitis B oder C positiv

### 3.10.4 Medikation

Die Prüfmedikation war Cicloral® Kapseln 100 mg, Fa. Hexal, Holzkirchen.  
Eine Kapsel enthält als arzneilich wirksamen Bestandteil 100 mg Ciclosporin.

Behandlung A: zwei Kapseln Cicloral®, Einnahme nach fettreichem Frühstück (Test)  
Behandlung B: zwei Kapseln Cicloral®, Einnahme nüchtern (Referenz)

Die Prüfmedikation wurde über die Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg bezogen. Die Medikation wurde für jeden Probanden und jede Periode einzeln abgepackt und gemäß §10 AMG beschriftet.

### 3.10.5 Durchführung der Studie

Nach Aufklärung durch den Prüfarzt und schriftlicher Einverständniserklärung wurden die Probanden körperlich untersucht und Blut zur Bestimmung der Laborparameter abgenommen. Zusätzlich wurde hierfür von jedem Probanden eine Urinprobe genommen. Waren alle Einschlusskriterien erfüllt und lag kein Ausschlusskriterium vor, so wurden die Probanden zu den beiden Kinetiktagen in das Prüfzentrum einbestellt.

Tabelle 4: Übersicht des zeitlichen Ablaufs der Studie

	Screening	Periode 1			Periode 2		
	Tg-14 bis 0	Tg 1	Tg 2	Tg 3	Tg 8	Tg 9	Tg 10
Einverständniserklärung	X						
Medizinische Anamnese	X						
Körperliche Untersuchung	X						X
EKG	X						
Blutbild, Serum-, Urinanalyse	X						X
Drogen-Screening	X						
Hepatitis Test, HIV Test <sup>1)</sup>	X						
Schwangerschaftstest	X						
Einschluss/Ausschlusskriterien	X	X					
Applikation Prüfmedikation		X			X		
Blutentnahme für Kinetik <sup>2)</sup>		X	X	X	X	X	X
Sammelurin <sup>3)</sup>		X	X		X	X	
Unerwünschte Ereignisse		X	X	X	X	X	X
Begleitmedikation	X	X	X	X	X	X	X
Blutbild, Serum-, Urinanalyse							X

Die Probanden erschienen am jeweiligen Kinetiktag nüchtern gegen 7:15 Uhr im Institut. Es wurde eine Verweilkanüle in eine Armvene gelegt und Blut entnommen (Leerwert). Dann wurde, gemäß Randomisierungsschema, der einen Hälfte der Probanden das fettreiche Frühstück gereicht, bestehend aus zwei Rühreiern, zwei Scheiben Speck, 120 g Bratkartoffeln, einem Schokocroissant und 250 ml Vollmilch (3,8 % Fettgehalt). Das Frühstück war somit gemäß den Empfehlungen der Food and Drug Administration (FDA) der USA zusammengestellt, die für Bioäquivalenzstudien zur Untersuchung des Nahrungseinflusses eine hochfette (ca. 50 % des gesamten Energiegehalts) und hochkalorische (ca. 800 – 1000 kcal) Mahlzeit fordert (FDA 2001

a). Direkt im Anschluss an das Frühstück wurde von allen Probanden die Prüfmedikation mit 200 ml Wasser unter Aufsicht eingenommen. Die zweite Hälfte der Probanden (Referenz) erhielt zwei Stunden nach der Nüchterneinnahme der Medikation ein fettarmes Frühstück, bestehend aus zwei Semmeln, Marmelade und Früchtetee. Entsprechend den unterschiedlichen Essgewohnheiten durfte die Menge Brötchen zwischen 1,5 und 2,5 schwanken. Nach der Blutentnahme nach fünf Stunden nahmen die Probanden das Mittagessen in der Mensa der Universität Regensburg ein. Vorgegeben war das Hauptgericht (Fleischgericht mit Beilage), das Getränk war freigestellt, durfte jedoch nicht koffeinhaltig sein. Nach ca. sieben Stunden wurde Gebäck mit Früchtetee angeboten. Das Abendessen war freigestellt. Über den Tag verteilt, beginnend nach zwei Stunden, waren die Probanden gehalten, zusätzlich ca. einen Liter Mineralwasser zu trinken. An den Kinetiktagen und am jeweils darauffolgenden Morgen bis zur 24h-Blutentnahme waren Rauchen, Alkohol oder koffeinhaltige Getränke nicht erlaubt. Bei der Nachuntersuchung wurden erneut eine körperliche Untersuchung durchgeführt, sowie Blut und Urin analysiert.

Tabelle 5: Detaillierter Ablauf eines Kinetiktages

1. Tag, Periode 1 oder 2				
Messpunkt		Toleranz Messzeitpu nkt ( $\pm$ min)	Blutprobe (3-4 ml)	Weitere Untersuchungen/Aktivitäten Leerurin
Nr.	Zeitpunkt			
				1. Urinfraktion (-24-0 h)
0	< - 0,5 h		X	Erscheinen der Probanden im Institut, Verweilkanüle, Test: <i>fettreiches Frühstück (standardisiert)</i>
	0 h Applikation			Einnahme: ca. 8 Uhr 2 Kapseln Cicloral <sup>®</sup> mit 200 ml Wasser
1	0.5 h	3	X	
2	1 h	3	X	
3	1.5 h	3	X	
4	2 h	3	X	
				Referenz: <i>kontinentales Frühstück (standardisiert)</i>
5	2.5 h	3	X	
6	3 h	5	X	
7	4 h	5	X	2. Urinfraktion (0-4 h)
8	5 h	10	X	
				<i>Mittagessen (standardisiert)</i>
9	6 h	10	X	
				<i>Snack (freiwillig)</i>
10	8 h	10	X	3. Urinfraktion (4-8 h)
11	10 h	10	X	
				<i>Abendessen (nicht standardisiert)</i>
12	12 h	10	X	4. Urinfraktion (8-12 h)
2. Tag, Periode 1 oder 2				
13	24 h	20	X	5. Urinfraktion (12-24 h)
14	32 h	30	X	6., 7. Urinfraktion (24-28 h, 28-32 h)
3. Tag, Periode 1 oder 2				
15	48 h	60	X	8. Urinfraktion (32-48 h), anschließend Nachuntersuchung

Die Probanden verbrachten die Kinetiktage in der Regel vollständig am Institut. Sie waren gehalten, Stresssituationen und Anstrengungen, die besonders auf die Cortisol- und Cortisonspiegel hätten Einfluss nehmen können, zu vermeiden. Um circadianen Änderungen z.B. bei den Cortisol- und Cortisonspiegeln Rechnung zu tragen, erfolgte die Einnahme der Prüfmedikation an den Kinetiktagen einheitlich gegen 8:00 Uhr.

### **3.10.6 Blut- und Urinproben**

Zur Entnahme der Blutproben wurden K-EDTA-Monovetten<sup>®</sup>, zur Entnahme der Plasmaproben Lithium-Heparin-Monovetten<sup>®</sup> verwendet. Die Entnahme erfolgte aus einer Armvene am Unterarm oder Ellenbogen – am Kinetiktag bis zwölf Stunden aus einer Verweilkanüle, sonst durch Punktion. Die Verweilkanülen wurden im Anschluss an jede Entnahme mit 1-2 ml physiologischer Kochsalzlösung mit 1 % Liquemin<sup>®</sup> N 25000 gespült, um Verstopfung zu vermeiden.

Der Urin wurde über den Zeitraum der jeweiligen Fraktion in Urilab-Flaschen gesammelt. Hiervon wurde ein Aliquot in 4,5 ml PPN-Röhrchen abgefüllt.

Die Blut-, Plasma- und Urinproben wurden bis zur Analyse bei –70 °C gelagert.

### **3.10.7 Datenmanagement**

Datenerhebung

Alle Daten wurden in Protokollbögen (CRFs) eingetragen und von dort nach Beendigung der Datenerhebung in tabellarischer Form zusammengestellt.

Pharmakokinetische Berechnung

Die pharmakokinetischen Parameter der Substanzen wurden modell-unabhängig individuell aus den Blutkonzentrationen ermittelt. Die maximalen Blutkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) und der zugehörige Zeitpunkt ( $t_{\max}$ ) wurden direkt aus den gemessenen Werten abgelesen. Die Eliminationshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) wurde durch log-lineare Regression im abfallenden Teil der Konzentrations-Zeit-Kurve, typischerweise von 10 bis 24 h, berechnet. Die Berechnung der Fläche unter Blutkonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) erfolgte mittels Trapezregel-Integration bis zum letzten Zeitpunkt ( $t_{\text{last}}$ ), an dem messbare Konzentrationen gefunden wurden ( $AUC_t$ ). Die Ermittlung der Restfläche ( $AUC_{t-\infty}$ ) erfolgte durch Division dieser Konzentration mit der Eliminationskonstanten, die sich aus der Halbwertszeit errechnen lässt ( $k_{\text{el}} = \ln 2 / t_{1/2}$ ). Die Summe beider Flächen ergibt die AUC von Null bis Unendlich ( $AUC_{\infty} = AUC_t + AUC_{t-\infty}$ ). Die Berechnungen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL 7.0 (Microsoft Corporation) durchgeführt.

Statistische Methoden

Ziel der statistischen Auswertung war die Bestimmung der relativen Bioverfügbarkeit von Ciclosporin und dessen Metaboliten AM1, AM1c, AM9 und AM4N nach Applikation von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup> mit je 100 mg Ciclosporin nach einem fettreichen Frühstück (Test) im Vergleich zur Nüchternapplikation (Referenz). Dazu wurden die Bioverfügbarkeitsparameter ( $AUC$ ,  $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ) beider Medikationen bestimmt und auf Bioäquivalenz geprüft (Steinijans und Hauschke, 1993). Es wurden die Quotienten Test/Referenz für die Parameter  $C_{\max}$  und  $AUC$  und die zugehörigen 90%-Konfidenzintervalle unter Verwendung eines Computerprogramms berechnet (BIOQPC V 1.2.2, erhalten von Dr. Steinijans, Byk-Gulden, Konstanz). Das Programm berechnet die Konfidenzintervalle mit Hilfe parametrischer und nichtparametrischer Verfahren (ANOVA, Wilcoxon-Test) direkt aus den Daten und/oder nach logarithmischer

Transformation. Als Bioäquivalenzbereiche wurden 80 – 125 % für AUC und  $C_{\max}$  gesetzt (Bereich für logarithmierte Daten) (FDA 2002). Zur Beurteilung von Unterschieden in  $t_{\max}$  wurden die individuellen Differenzen in  $t_{\max}$  gebildet und basierend auf dem Wilcoxon-Test das Konfidenzintervall berechnet. Unterschiede in  $t_{\max}$  wurden abgelehnt wenn das 90%-Konfidenzintervall den Wert Null beinhaltete (Blume und Mutschler 1989, Steinijans und Hauschke 1993).

### **3.11 Pilotstudie: Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cyclosporine Capsules (EonLabs) vs. Cicloral® (Hexal) an gesunden Probanden**

Studiencode: EON-CIC-BV-1

#### **3.11.1 Studienziel**

Primäres Studienziel

Ziel der Studie war die Bestimmung der relativen Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus zwei Kapseln Cicloral® 100 mg im Vergleich zur Applikation von zwei Kapseln Cyclosporine Capsules (EON) 100 mg.

Zielparameter waren die Bestimmung des Ausmaßes der Bioverfügbarkeit gemessen an der Fläche unter der Blut-Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) und der Geschwindigkeit des Anflutens des Wirkstoffs im Blut, gemessen an den Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) und dem Zeitpunkt von  $C_{\max}$  ( $t_{\max}$ ).

Sekundäre Studienziele

Als weitere pharmakokinetische Kenngröße wurde die Eliminationshalbwertszeit  $t_{1/2}$  ermittelt. Während der Studie wurden „Unerwünschte Ereignisse“ erfasst.

Darüber hinaus sollten folgende Parameter analysiert werden:

Ciclosporin-Metaboliten AM1, AM1c, AM9 und AM4N im Vollblut

Cortisol- und Cortisonspiegel im Plasma

Blutdruck und Herzfrequenz

#### **3.11.2 Studienplan und Probanden**

Die Pilotstudie war eine offene, dreifache Cross-over-Untersuchung mit randomisierter Zuteilung des Behandlungsschemas (außer Behandlung C, siehe Punkt 3.11.4) und wurde als Selbstversuch durchgeführt. Als Probanden stellten sich zwei Mitarbeiter des Lehrstuhls für Pharmakologie der Universität Regensburg zur Verfügung.

#### **3.11.3 Medikation**

Die Prüfmedikation war:

Behandlung A: 2 Kapseln Cicloral® mit je 100 mg Ciclosporin

Behandlung B: 2 Kapseln Cyclosporine Capsules mit je 100 mg Ciclosporin

Behandlung C: keine Medikation

Die Prüfmedikation wurde über die Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg bezogen.

#### **3.11.4 Durchführung der Studie**

Die Durchführung der Untersuchung erfolgte analog der Studie CIC-BV-1 (siehe Punkt 3.10), mit folgenden Abweichungen:

Periode 1: 01.08.2002 (bei beiden Probanden Behandlung A)

Periode 2: 06.08.2002 (bei beiden Probanden Behandlung B)

Periode 3: 29.10.2002 (bei beiden Probanden Behandlung C)

Behandlung C war nicht randomisiert; der Kinetiktag verlief entsprechend Behandlung A und B, jedoch ohne Ciclosporin-Medikation

Vor- und Nachuntersuchung entfielen

der zeitliche Ablauf eines Kinetiktages war gleich, allerdings wurde das Mittagessen bereits nach vier Stunden eingenommen. Die Kinetik wurde zum Zeitpunkt  $t = 32$  h beendet und auf die Probennahme bei  $t = 48$  h verzichtet

kein Vergleich von fettreicher zu normalfetter Nahrung, deshalb kein fettreiches, sondern ausschließlich fettarmes, standardisiertes Frühstück 2 h nach Medikationseinnahme (analog Behandlung B der Studie CIC-BV-1)

zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 8 h wurden Blutdruck und Herzfrequenz gemessen

#### **3.11.5 Datenmanagement**

Datenerhebung, pharmakokinetische Berechnung und statistische Methoden entsprachen der Studie CIC-BV-1. Da anhand der Daten von zwei Probanden aus statistischen Gründen keine Aussagen zur Bioäquivalenz gemacht werden können, wurde auf deren Prüfung verzichtet.

### **3.12 Analyse von Ciclosporin und Ciclosporin-Metaboliten in verschiedenen organischen Matrices**

Die Bestimmung der Konzentrationen von Ciclosporin und dessen Metaboliten AM1, AM1c, AM9 und AM4N in Vollblut, Urin, gepufferter Lösung, sowie den Organen Leber, Niere und Ileum wurde mit Hilfe validierter HPLC-Methoden durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Recipe, München). Die verwendeten HPLC-Bedingungen basierten auf bereits publizierten Methoden (Brozmanova et al. 2001, Christians und Zimmer 1987).

### 3.12.1 Probenvorbereitung

Die Aufbereitung der Proben erfolgte in leicht abgewandelter Weise zur Anleitung des ClinRep®-Komplettkits "Ciclosporin und Metaboliten im Vollblut" der Firma Recipe (detaillierte Aufstellung siehe Tabelle 6).

Das eingesetzte Volumen von Vollblut-, Urin- und Puffer-Proben (= Probenvolumen) lag bei 0,2 - 1 ml. Diesem wurden 50 µl oder 100 µl Interner Standard (= 250 ng / 500 ng Cyclosporin D, I.S.) und 2 ml (bei Urinproben 1 ml) Präzipitationsreagenz (Zinksulfat 10 % in Acetonitril-Methanol-Mischung) zugesetzt. Zur Erreichung einer möglichst vollständigen Eiweißfällung wurden die Proben ca. 20 sec am Vortex gemischt, danach 5 min im Kühlschrank aufbewahrt und bei 4000 U/min 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein, mit Methanol und Reinstwasser konditioniertes Extraktionssäulchen dekantiert und mit einem Absaugtopf durch die Packung der Säule gesogen. Die Analyten werden dabei adsorbiert. Zur Entfernung polarer Verunreinigungen folgte die Zugabe von 2,5 ml (bei Urinproben 2 x 2 ml) Waschlösung W (Acetonitril-Wasser-Mischung), danach wurden lipophile Verunreinigungen mit 0,5 ml Heptan ausgewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen, die Spitzen der Absaugkanülen getrocknet und mit 0,3 ml Elutionsreagenz E 2 min durchgesaugt. Die hierbei desorbierten Analyten wurden in 4,5 ml PPN Röhrchen aufgefangen und mit 1 ml Heptan und 0,1 ml Reinstwasser versetzt, entsprechend einem Elutionsvolumen von 0,4 ml. Nach 20 sec Mischen am Vortex und erneutem Zentrifugieren (4000 U/min, 2 min) wurden 150 µl der unteren Ethanol-Wasser-Phase in Glas-Minivials abpipettiert, wovon 10 – 50 µl in die Säule injiziert wurden.

Zur Aufbereitung von Organproben wurden ca. 100 mg Gewebe in einem 4,5 ml PPN Röhrchen mit 1 ml isotoner Kochsalzlösung und 100 µl internem Standard versetzt. Nach 5 sec Homogenisierung am Ultraturrax und Zugabe von 2 ml Präzipitationsreagenz wurde analog der Vollblutproben weiter verfahren.

Die Proben aus Versuch 3.8 wurden nicht aufbereitet, sondern nach Verdünnung direkt in die HPLC-Säule injiziert.

Tabelle 6: Chromatographische Bedingungen der einzelnen Versuche (I.S. = Interner Standard CsD, Eluent = MeCN-MeOH-H<sub>2</sub>O)

Versuch (Nr.)	Proben-Vol (µl)	I.S.-Vol (µl)	Säule (Phenomenex)	Eluent (ml)	T (°C)	Injektions-Vol (µl)
3.6 Donor Akzeptor	1000	100	PhenylHexyl	200-80-140	75	10
	500	100	PhenylHexyl	200-80-140	75	50
3.7	200	100	PhenylHexyl	200-80-140	75	20
3.8	---	---	Polar RP	200-20-140	70	20
3.9	600	100	Polar RP	200-20-140	70	50
3.10 Urin Vollblut	500	100	Polar RP	200-20-180	75	50
	1000	50	Polar RP	200-20-180	75	50
3.11	1000	50	Polar RP	200-20-180	75	50

Sehr hoch konzentrierte Proben wurden vor der Aufbereitung verdünnt. Dies war der Fall für die Donorproben aus Versuch 3.6 (1:50), sowie die Proben aus Versuch 3.7 (1:20) und 3.8 (1:100).



### 3.12.2 Chromatographisches System

Folgendes chromatographisches System wurde verwendet:

HPLC:	Pumpe LC 10AT, Autosampler SIL-10A, Steuergerät SCL-10A, Integrator Class-LC10, Säulenofen ERC125
Detektor:	SPD 10A (205 nm)
Säulen:	Phenomenex Luna Phenylhexyl, 5 µm, 150 x 4,6 mm Phenomenex Synergi 4 µm Polar RP 80A, 150 x 4,6 mm
Eluent:	Acetonitril – Methanol – Wasser
Fluss:	1 ml/min, 2 ml/min (s.u.)
Substanzen:	CsA, CsD, AM1, AM1c, AM4N, AM9
Wiederfindung:	Metaboliten: ca. 80 %, CsA: ca. 70 %, CsD: ca. 60 %
Best.Grenze:	15 ng/ml für CsA

In der Regel erfolgte die Analyse unter isokratischen Bedingungen bei einem Fluss von 1 ml/min. Für die beiden Kinetikstudien CIC-BV-1 (3.10) und EON-CIC-BV-1 (3.11) wurde ein System mit Flussgradient etabliert. Dieses erlaubte sowohl eine ausreichende Auftrennung der strukturell sehr nah verwandten Ciclosporin-Metaboliten, wie auch eine relativ schnelle Elution von CsA und dem internen Standard CsD.

Bei der früher durchgeführten Analyse der Proben aus der Studie EON-CIC-BV-1 verursachte das schnelle Wechseln des Flusses (innerhalb von 0,2 min) eine verhältnismäßig starke Drift der Basislinie (siehe Abb. 8). Diesem Phänomen wurde bei der Studie CIC-BV-1 durch Verdreifachung dieses Zeitraumes auf 0,6 min begegnet (siehe Abb. 9).

Tabelle 7: Zeitprogramm der Flussgradienten (min)

Fluss (ml/min)	CIC-BV-1	EON-CIC-BV-1
1	0.0 – 10.4	0.0 – 12.9
2	11.0 – 20.0	13.1 – 20.5
1	20.5 – 21.0	20.7 – 22.0

Sofern die Ergebnisse intraindividuell zu vergleichen waren (cross-over-Design), wurden die Proben eines Probanden beider Untersuchungstage in einem Assay analysiert, um systematische Fehler durch Inter-Assay-Variation zu vermeiden.

Für die Analytik in der Studie CIC-BV-1 wurden zur Absicherung der, von der Fa. Recipe angeführten analytischen Kenndaten, in jedem Assay ein Leerwert und dotierte Kontrollproben mitgeführt. Dabei lag die Konzentration von Kontrolle 1 im oberen, die von Kontrolle 2 im unteren Bereich der zu erwartenden Konzentrationen. Mit Hilfe dieser Kontrollen wurden die analytischen Kenndaten Präzision und Richtigkeit (Bias) ermittelt.

Tabelle 8: Präzision und Richtigkeit (Bias) der Bestimmung von Ciclosporin und der Metaboliten AM1 und AM9 im Vollblut von zwölf Assays der Studie CIC-BV-I.

	Sollwert (ng/ml)	Istwert (ng/ml)	Intra-Assay- Präzision (%)	Richtigkeit (%)
CsA	800	918	13	+ 15
	50	56	9	+ 12
AM1	200	282	6	+ 41
	12,5	17	5	+ 36
AM9	200	274	6	+ 37
	12,5	16	8	+ 28

Ein Assay gliederte sich typischerweise wie folgt:

1 Proband x 2 Tage x 16 Proben	32 Proben
1 Leerplasma (Anfang)	1 Probe
3 Referenzstandards (Anfang, Mitte, Ende)	3 Proben
4 Kontrollproben, 2 x KA, 2 x KC (Anfang, Ende)	4 Proben
	<hr/> 40 Proben <hr/>

### 3.12.3 Auswertung

Die vom Integrator gelieferten Messwerte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und die Peakhöhen nach der Methode des internen Standards ausgewertet (mit Ausnahme von Versuch 3.8, der über den Referenzstandard ausgewertet wurde). Zur Erkennung von Übertragungsfehlern wurden auch die Peakflächen ausgewertet und mit der Auswertung über die Peakhöhen verglichen. Beide Methoden sollten übereinstimmende Resultate liefern. Proben mit gemessenen Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze wurden 'Null' gesetzt.

### 3.12.4 Beispielchromatogramme

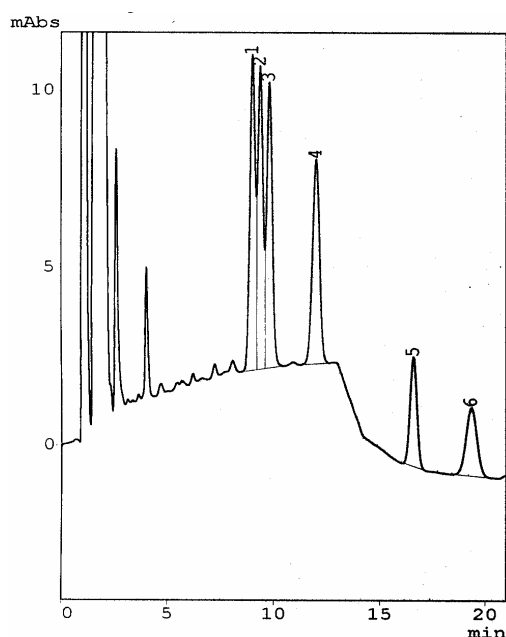


Abbildung 8: Referenzstandard (SR) zur Studie EON-CIC-BV-1 mit einer einheitlichen Konzentration von 1250 ng/ml. 1 = AM1, 2 = AM9, 3 = AM1c, 4 = AM4N, 5 = CsA, 6 = CsD. Injektionsvolumen: 50  $\mu$ l.

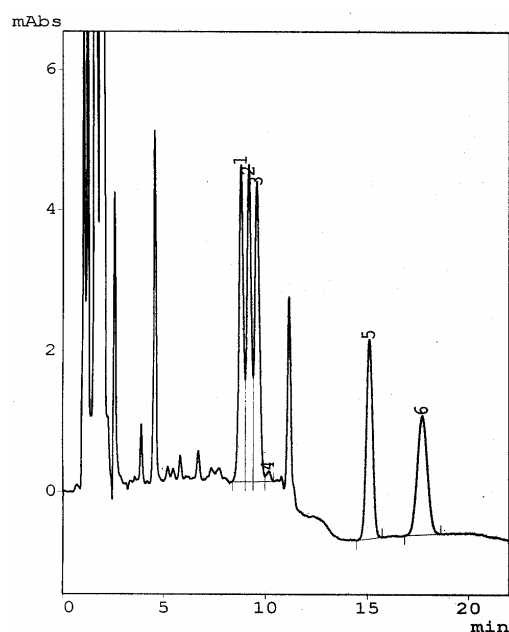


Abbildung 9: Referenzstandard (SR) zur Studie CIC-BV-1. Die Konzentration der Metaboliten war 1000 ng/ml, von CsA und CsD 2000 ng/ml. 1 = AM1, 2 = AM9, 3 = AM1c, 5 = CsA, 6 = CsD, (4 = Störpeak). Injektionsvolumen: 25  $\mu$ l

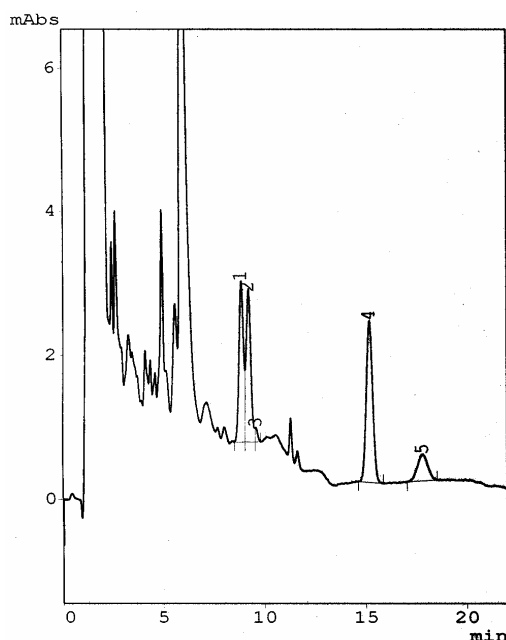


Abbildung 10: Kontrolle A der Studie CIC-BV-1. Die Konzentration der Metaboliten war 200 ng/ml, von CsA und CsD 800 ng/ml. 1 = AM1, 2 = AM9, 4 = CsA, 5 = CsD, (3 = Störpeak). Injektionsvolumen: 25  $\mu$ l

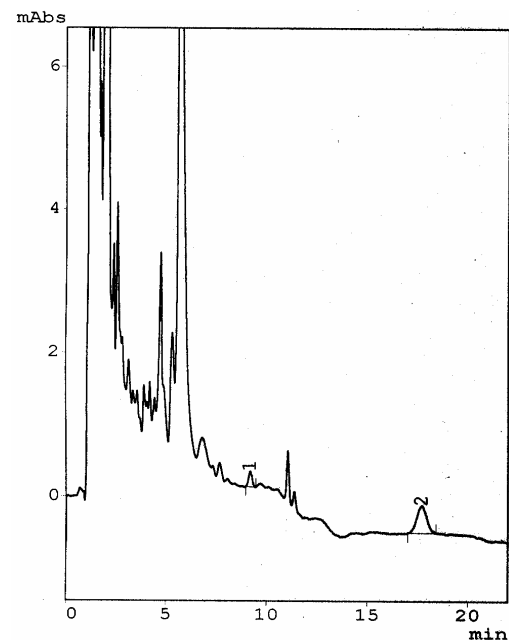


Abbildung 11: Leerwert der Studie CIC-BV-1. 2 = CsD, (1 = Störpeak). Injektionsvolumen: 25  $\mu$ l

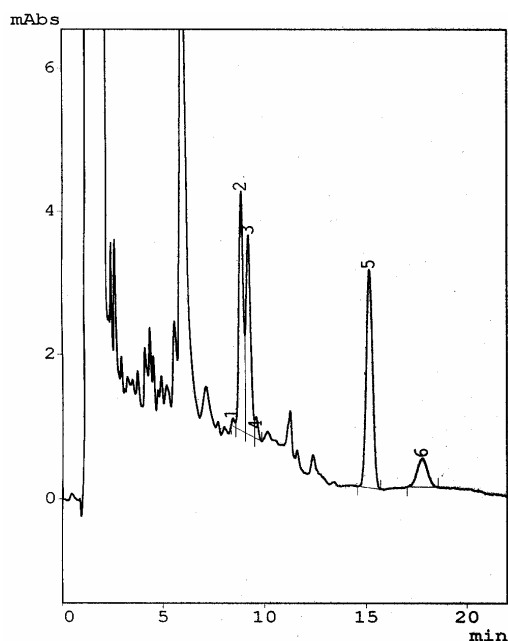


Abbildung 12: Vollblutprobe eines Probanden der Studie CIC-BV-1 1,5 h nach Einnahme der Medikation. Die Konzentration war für AMI 396,6, AM9 337,7 und CsA 1121,1 ng/ml. 2 = AMI, 3 = AM9, 5 = CsA, 6 = CsD, (1, 4 = Störpeaks). Injektionsvolumen: 25 µl

### 3.13 Analyse von Cortisol und Cortison im Plasma

Für die Bestimmung der Plasmaspiegel von Cortisol und Cortison wurde, ausgehend von einem bereits veröffentlichten Verfahren (Santos-Montes et al. 1994, Santos-Montes et al. 1995) eine neue HPLC-Methode entwickelt (Kees et al. 2002). Hierbei wird Plasma mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 9 gepuffert und mit Dichlormethan extrahiert. Dieses wird eingedampft, der Rückstand in mobiler Phase aufgenommen und ein Aliquot injiziert. Als interner Standard wird Methylprednisolon (MPL) mitgeführt.

#### 3.13.1 Probenvorbereitung

In 4,5 ml PPN Röhrchen wurden 0,5 ml Plasma vorgelegt, 50 µl interner Standard (MPL 2 µg/ml) zugesetzt und mit 0,3 ml NaHCO<sub>3</sub> auf pH 9 gepuffert. Nach dem Mischen (Reax) und Zugabe von 2 ml Dichlormethan wurde 10 min über Kopf geschüttelt und anschließend zentrifugiert (4000 U/min, 10 min). Die oberliegende Wasserphase wurde exakt, doch möglichst ohne Verluste über eine Pasteurpipette abgesaugt. Nach Trocknen mit 100-150 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wasserfrei wurde erneut 5 min über Kopf geschüttelt und abzentrifugiert (4000 U/min, 5 min). Das überstehende Dichlormethan wurde in neue PPN Röhrchen dekantiert und eingedampft. Der Rückstand wurde mit 150 µl Eluent aufgenommen und kurz anzentrifugiert (4000 U/min, 1 min), um Lösemittelreste von der Wandung der Röhrchen zu entfernen. Die Lösung wurde in HPLC-Minivials aus Kunststoff abgefüllt und 50 µl in die Säule injiziert.

### 3.13.2 Chromatographisches System

Folgendes chromatographisches System wurde verwendet:

HPLC:	Pumpe LC 10AT, Autosampler SIL-10A, Steuergerät SCL-10A, Integrator Class-LC10, Säulenofen ERC125
Detektor:	SPD 10A (245 nm)
Säulen:	Phenomenex Synergi 4µm Polar RP 80A, 150 x 4,6 mm
Säulentemp.:	30 °C
Eluent:	700 ml Wasser, 300 ml Acetonitril
Fluss:	1 ml/min
Substanzen:	Cortisol (CSL), Cortison (CSN), 6α-Methylprednisolon (MPL)
Wiederfindung:	60-90 %; nicht quantitativ, da beim Absaugen unterschiedlich viel Dichlormethan verloren geht
Best.Grenze:	5 ng/ml

Da die Ergebnisse der Kinetikstudien 3.10 und 3.11 intraindividuell zu vergleichen waren (cross-over-Design), wurden die Proben eines Probanden beider Untersuchungstage in einem Assay analysiert, um systematische Fehler durch Inter-Assay-Variation zu vermeiden. Bei Versuch 3.10 wurden die Proben beider Kinetiktage von insgesamt drei Probanden je Assay analysiert.

Zur Qualitätssicherung wurden bei jedem Assay Kontrollen mit einer Cortisol-Konzentration von 300 und 50 ng/ml mitgeführt. Die Konzentrationen von Cortison in den Kontrollen betrug jeweils ein Fünftel der Cortisolwerte.

Tabelle 9: Präzision und Richtigkeit (Bias) der Bestimmung von Cortisol (CSL) und Cortison (CSN) im Plasma von sieben Assays der Studie CIC-BV-I.

	Sollwert (ng/ml)	Istwert (ng/ml)	Intra-Assay- Präzision (%)	Richtigkeit (%)
CSL	300	306	18	+ 2
	50	48	20	- 4
CSN	60	54	20	- 10
	10	9	27	- 10

Bei jedem Assay wurden Standardreihe, Leerplasma, hoch- und niedrigkonzentrierte Kontrolle je zweifach mitgeführt. Zur Herstellung der Standardreihen und Kontrollen wurde Leerplasma dotiert. Dieses wurde einem freiwilligen Probanden grundsätzlich abends entnommen, da hier die physiologischen Spiegel von Cortisol und Cortison relativ niedrig sind.

Tabelle 10: CSL- und CSN-Konzentrationen der Standardreihe und Kontrollen

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	K-A	K-B
CSL (ng/ml)	1000	500	200	100	50	20	300	50
CSN (ng/ml)	200	100	40	20	10	4	60	10

### 3.13.3 Beispielchromatogramme

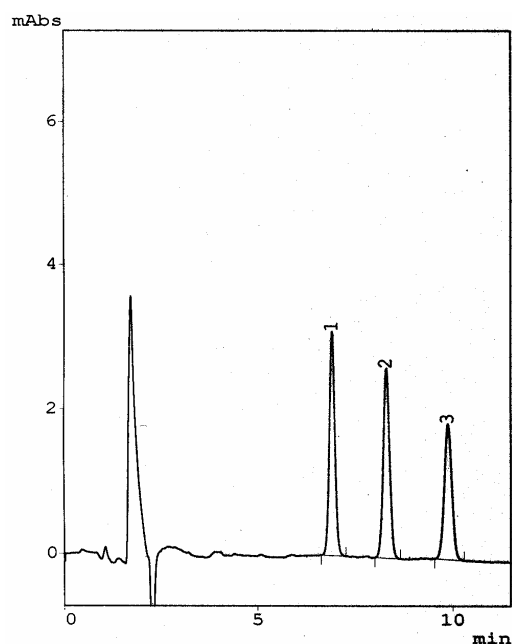


Abbildung 13: Referenzstandard (SR) mit einer einheitlichen Konzentration von 250 ng/ml; 1 = CSL, 2 = CSN, 3 = MPL, Injektionsvolumen: 50 µl.

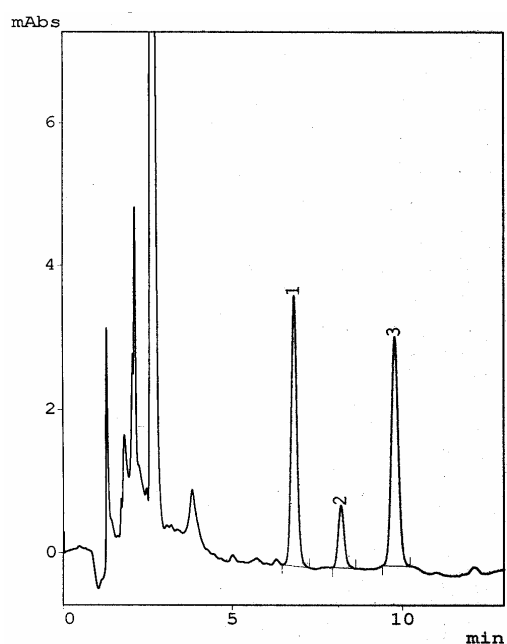


Abbildung 14: Standard mit einer Konzentration von 100 ng/ml CSL und 20 ng/ml CSN. 1 = CSL, 2 = CSN, 3 = MPL, Injektionsvolumen: 50 µl.

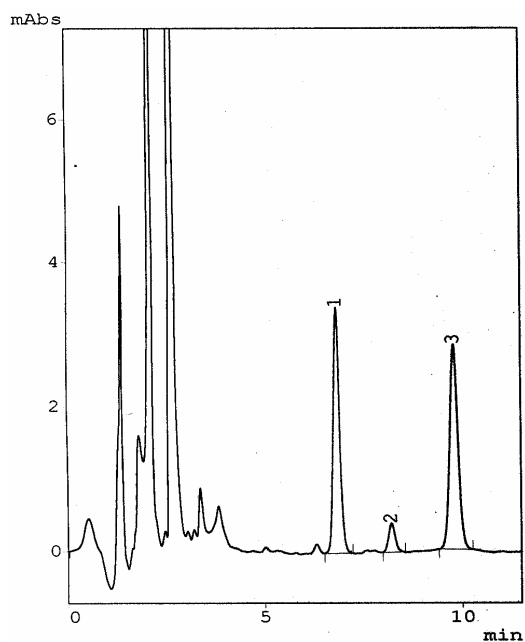


Abbildung 15: Plasmaprobe eines Probanden um ca. 8:00 Uhr mit einer Konzentration von 172,5 ng/ml CSL und 19,4 ng/ml CSN. 1 = CSL, 2 = CSN, 3 = MPL, Injektionsvolumen: 50 µl.

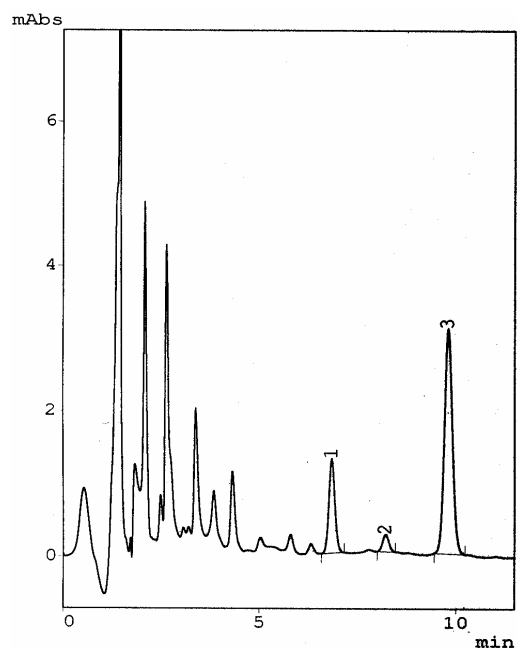


Abbildung 16: Plasmaprobe eines Probanden um ca. 18:00 Uhr mit einer Konzentration von 60,3 ng/ml CSL und 10,6 ng/ml CSN; 1 = CSL, 2 = CSN, 3 = MPL, Injektionsvolumen: 50 µl.

### **3.13.4 Auswertung**

Die Auswertung erfolgte anhand der Peakhöhen (die Peakflächen wurden zur Kontrolle mitgeführt) über die Standardreihe. Nach Normierung der Standards auf die mittlere Wiederfindung des internen Standards wurde die Standardgerade über die Gleichung  $y = mx + b$  erstellt. Die Plasmaproben wurden ebenfalls auf die mittlere Wiederfindung des internen Standards der Standardproben normiert und die Konzentrationen von Cortisol und Cortison über  $x = y/m$  aus der Standardgerade ermittelt.

## **3.14 Analyse von Prostacyclin im Urin**

Zur Bestimmung der Urinspiegel von Prostacyclin diente ein kommerziell erhältlicher enzyme immuno assay (EIA)-kit der Firma Cayman Chemical. Dieser beruht auf dem Nachweis von 6-keto PGF<sub>1α</sub>, einem der Hauptmetaboliten des Prostacyclins.

Das Prinzip des Assays ist die Konkurrenz von 6-keto PGF<sub>1α</sub> in der Probe und einer konstanten Menge 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat (Tracer) um eine limitierte Anzahl an spezifischen 6-keto PGF<sub>1α</sub>-Antikörpern. Die Menge an Tracer, welche mit Antikörpern komplexiert, ist dabei indirekt proportional zur Menge 6-keto PGF<sub>1α</sub> in der Probe. Die jeweiligen Antigen-Antikörper-Komplexe binden an, am Boden der Wells befindliche monoklonale Antikörper. Ungebundene Reagenzien werden entfernt und mit Ellmans Reagenz, welches das Substrat für die Acetylcholinesterase (AChE) enthält, zu einem gelben Produkt (5-Thio-2-Nitrobenzoesäure) umgesetzt. Dieses besitzt eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm. Die Farbintensität ist dabei indirekt proportional zur Konzentration von 6-keto PGF<sub>1α</sub> in der Probe (siehe Abbildung 17).

### **3.14.1 Durchführung**

Die Durchführung erfolgte in 96 Well-Mikrotiterplatten gemäß den Kits beiliegender Anleitung. Da, wie bereits geschildert, die Ergebnisse intraindividuell zu vergleichen waren (cross-over-Design), wurden die Proben eines Probanden beider Untersuchungstage in einem Assay analysiert, um systemische Fehler durch Inter-Assay-Variation zu vermeiden. Als Kontrollen zu den Urinfraktionen der Probanden dienten analoge Urinfraktionen (0-4, 4-8, 8-12 und 12-24 h) von fünf Mitarbeitern des Lehrstuhls, die keine Ciclosporin-Medikation erhalten hatten.

Der Urin wurde in einer Verdünnung von 1:16 und 1:31 eingesetzt, wobei sich 1:16 als überlegen herausstellte. Die Inkubationsdauer nach Zugabe des Ellmans Reagenzes betrug drei Stunden. Die anschließende Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde mit einem Plate-Reader am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg vorgenommen.

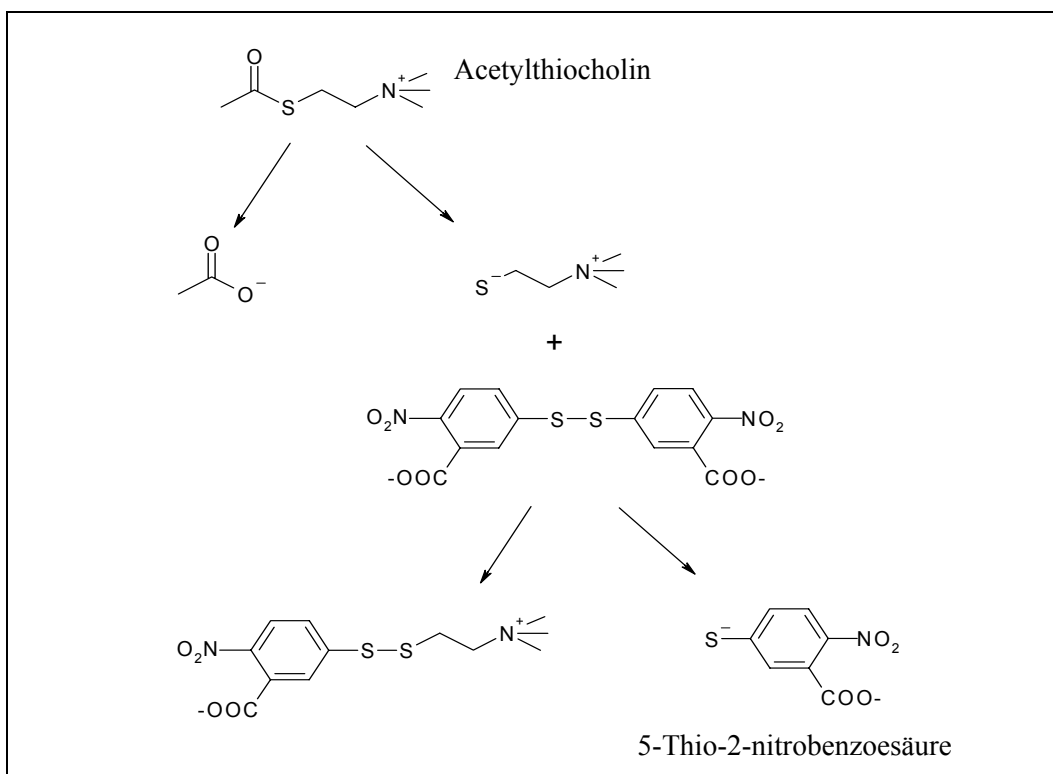


Abbildung 17: Farbreaktion zu 5-Thio-2-nitrobenzoatesäure zum indirekten Nachweis von 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$  bzw.  $\text{TxB}_2$  (6-keto Prostaglandin  $\text{F}_{1\alpha}$  EIA Kit, Thromboxane  $\text{B}_2$  EIA Kit).

### 3.14.2 Auswertung

Die Auswertung der Kits erfolgte nach Leerwertabzug über die externe Standardmethode. Die Standardgerade wurde durch lineare Auftragung der optischen Dichte auf der Ordinate und durch logarithmierte Auftragung der Konzentration auf der Abszisse erhalten. Das Bestimmtheitsmaß betrug im Mittel  $r^2 = 0,96$ . Werte die außerhalb der Standardgeraden lagen wurden nicht berücksichtigt.

## 3.15 Analyse von Thromboxan $\text{A}_2$ im Urin

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ) wurde ebenfalls ein EIA-Kit der Firma Cayman Chemical verwendet, der nach exakt gleichem Schema wie obiger Kit funktioniert (siehe Abb. 17). Als Analyt diente hier Thromboxan  $\text{B}_2$  ( $\text{TxB}_2$ ), das durch nichtenzymatische Hydrolyse aus  $\text{TxA}_2$  entsteht.

Die Durchführung und Auswertung erfolgte wie unter Punkt 3.14 beschrieben, mit folgenden Abweichungen:

die Verdünnung der Urinproben lag bei 1:5 und 1:16, letztere erwies sich als geeigneter doppellogarithmische Auftragung der Standardgeraden  
mittleres Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,98$



### 3.16 Analyse von Stickstoffmonoxid (NO) im Urin (CIC-BV-1)

NO wird im Organismus über zahlreiche Wege verstoffwechselt, an deren Ende Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) stehen. Das Verhältnis der beiden Produkte ist dabei variabel. Mit Hilfe des verwendeten kolorimetrischen Assay-Kits der Firma Cayman Chemical konnten Nitrit und Nitrat in ihrer Gesamtkonzentration bestimmt werden. In einem ersten Schritt wird Nitrat mittels Nitrat-Reduktase zu Nitrit reduziert. In einem zweiten Schritt wird nach Zugabe von Griess Reagenz-1 (Sulfanilamid) und Griess Reagenz-2 (N-(1-Naphthyl)ethyldiamin) das Nitrit zu einem tiefvioletten Azofarbstoff umgesetzt. Die Intensität der Färbung ist hier proportional zur Nitritkonzentration.

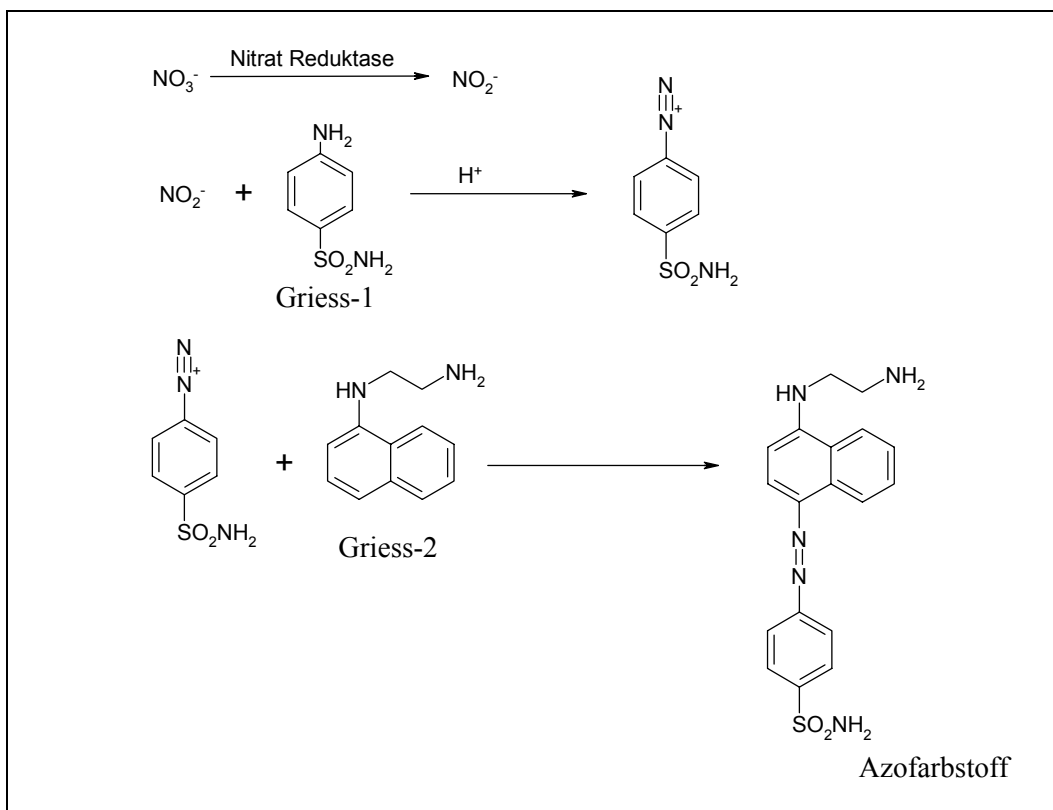


Abbildung 18: Farbreaktion zu einem Azofarbstoff zum Nachweis von Nitrit/Nitrat (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Fa. Cayman).

Die Durchführung und Auswertung erfolgte gemäß, den Kits beiliegender Anleitung.

Folgende Bedingungen wurden dafür gewählt:

Verdünnung der Urinproben 1:31

Inkubation von 15 min nach Zugabe von Griess Reagenz

Messung bei 570 nm mittels Plate-Reader

doppellineare Auftragung der Standardgeraden

Korrelation  $r^2 > 0,99$

### 3.17 Bestimmung des Kreatinins in Plasma und Urin

Die Analyse der Kreatinin-Spiegel im Plasma erfolgte nach Enteiweißung anhand der Jaffé-Reaktion. Die Methode basiert auf der Bildung eines gelbgefärbten Komplexes von Kreatinin und Pikrat, das in alkalischem Milieu aus Pikrinsäure entsteht.

Jeder Assay bestand aus Leerwert, Standard und Proben. Als Leerwert diente eine Mischung von je 0,5 ml Aqua dest. und Trichloressigsäure (1,2 mol/l), als Standard eine Mischung von je 0,5 ml Kreatinin-Lösung (2 mg/dl) und Trichloressigsäure (1,2 mol/l). Von jeder Probe wurde 1 ml als Probenvolumen eingesetzt. Nach Enteiweißung mit 1 ml 1,2-M-Trichloressigsäure und Abzentrifugieren (10 min, 4000 U/min) des Niederschlags wurde der Überstand in ein frisches Reagenzglas dekantiert. Anschließend wurde 1 ml einer Mischung aus gleichen Teilen 1,6 M NaOH und 35 mM Pikrinsäure zugegeben und 20 min bei 25 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die spektralphotometrische Messung der Absorption erfolgte bei 520 nm in einer Küvette der Schichtdicke 1 cm.

Die Konzentrationen wurden anhand folgender Formeln berechnet:

Plasma	Urin
$C \text{ (mg/dl)} = 2,0 \times E_{\text{Probe}} / E_{\text{Standard}}$	$C \text{ (mg/dl)} = 100 \times E_{\text{Probe}} / E_{\text{Standard}}$

Die Berechnung der Kreatinin-Clearance (CL) erfolgte mit der Formel:

$$CL \text{ (ml/min)} = \frac{\text{Urin-Krea (mg/dl)} \times 24\text{h-Urinvolumen}}{\text{Serum-Krea (mg/dl)} \times 1440 \text{ min}}$$

Als Normbereiche für junge Männer wurden festgesetzt:

Plasma	< 1,3 mg/dl (Thomas 1992)
Urin	1,0 – 2,5 g/24h (Keller 1991)
Clearance	98 – 156 ml/min (Schirmeister et al. 1964).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 In vitro Untersuchung zur Resorption von Ciclosporin am isolierten Rattenileum

Die mittlere Wiederfindung von Ciclosporin in der Donorlösung des Organbads zeigte bei Sandimmun® Optoral (OPT) und Gengraf™ (GEN) über den gesamten Zeitraum von 4 h einen fast deckungsgleichen Verlauf. Die Wiederfindung nach einer Stunde entsprach mit 100 % dem Ausgangswert. Im weiteren Verlauf war ein annähernd linearer Abfall auf ca. 90 % nach 4 h festzustellen. In der Donorlösung von Cyclosporine Capsules (EON) reduzierte sich die Wiederfindung bereits nach einer Stunde auf ca. 75 % und blieb bis 4 h konstant auf diesem Niveau. Die Unterschiede von EON zu GEN und OPT waren in der Donorlösung nicht signifikant.

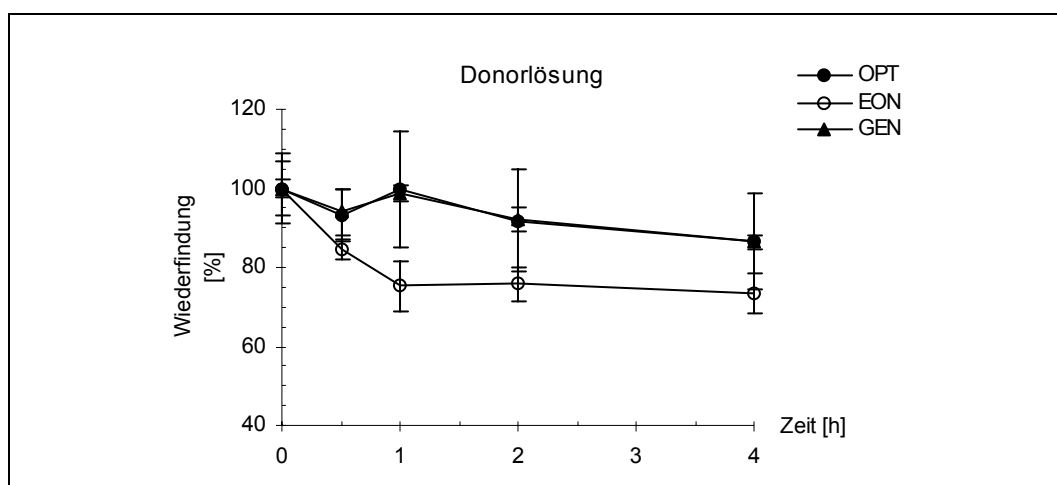


Abbildung 19: Prozentuale Wiederfindung von Cyclosporin A in der Donorlösung des Organbads. OPT = Sandimmun® Optoral, EON = Cyclosporine Capsules, GEN = Gengraf™ (MW ± SEM, n = 5).

In der Akzeptorlösung war initial ein deutlicher Anstieg der Konzentration von Ciclosporin bei allen Testpräparaten zu verzeichnen. Im Fall von OPT wurde mit knapp 6 µg/ml mehr als das Doppelte des Werts von GEN erreicht. Die mittlere Konzentration von OPT sank mit 3 µg/ml dann wieder auf das Niveau von EON und GEN, das im weiteren Verlauf bis 4 h konstant blieb. In der Akzeptorlösung waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

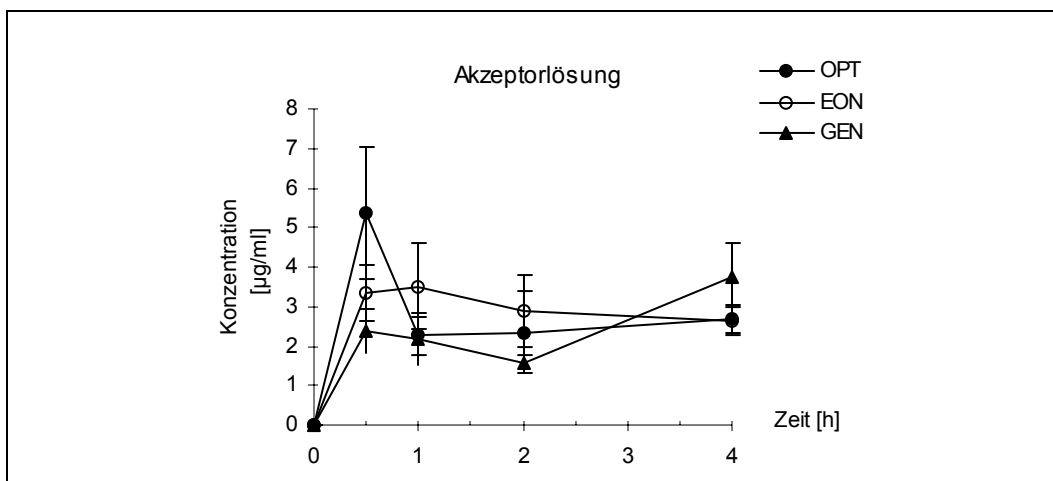


Abbildung 20: Konzentration von Ciclosporin in der Akzeptorlösung in µg/ml. OPT = Sandimmun® Optoral, EON = Cyclosporine Capsules, GEN = Gengraf™ (MW ± SEM, n = 5).

Im Gewebe des Ileums verlief der Anstieg der Ciclosporin-Konzentrationen bei allen Testpräparaten annähernd linear auf Werte zwischen 190 µg/g bei OPT und 270 µg/g bei GEN zum Zeitpunkt 4 h. Dabei waren zu den Zeitpunkten 0,5 und 1 h die Werte von EON signifikant höher als bei OPT, bei 4 h überstieg GEN signifikant OPT und EON ( $p < 0,05$ ).

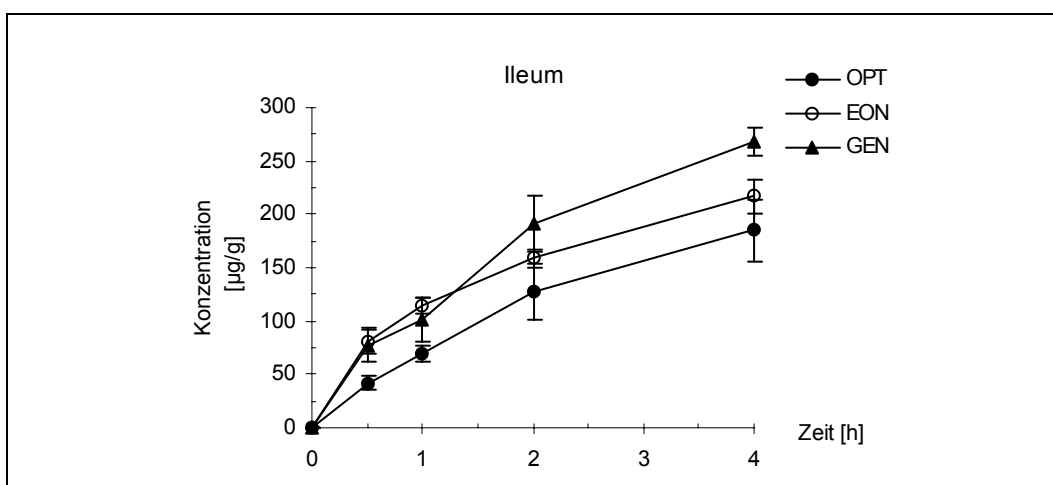


Abbildung 21: Konzentration von Ciclosporin im Ileum in µg/g. OPT = Sandimmun® Optoral, EON = Cyclosporine Capsules, GEN = Gengraf™ (MW ± SEM, n = 5).

## 4.2 Adsorption von Ciclosporin aus gelösten Kapseln an Glasoberflächen

Nach Verdünnen des Inhalts (ohne Kapselmateriale) der Ciclosporin-Kapseln mit 8 ml Wasser resultierte bei Sandimmun® (SIM) eine milchigtrübe Emulsion, während bei OPT die Transparenz des ursprünglichen Kapselinhalts erhalten blieb. Bei EON und Cicloral® (CIC) zeigte sich übereinstimmend eine leichte Trübung, darüber hinaus aber auch ein rasch sedimentierender milchiger Bodensatz.



Abbildung 22: Inhalt aus CsA-Kapseln mit je 100 mg Wirkstoff direkt nach Verdünnen mit 8 ml Wasser, von links: Sandimmun® Optoral, Cyclosporine Capsules (EON), Cicloral®, Sandimmun®.

Während die Wiederfindung von Ciclosporin bei OPT über 6 h konstant blieb, zeigte sich bei CIC nach 6 h ein Abfall auf ca. 70 %, bei SIM und EON auf ca. 40 %. Die Unterschiede zur Referenz OPT waren bei SIM zu jedem Zeitpunkt, bei EON zu t-4 h und t-6 h und bei CIC zu t-6 h signifikant ( $p < 0,05$ ).

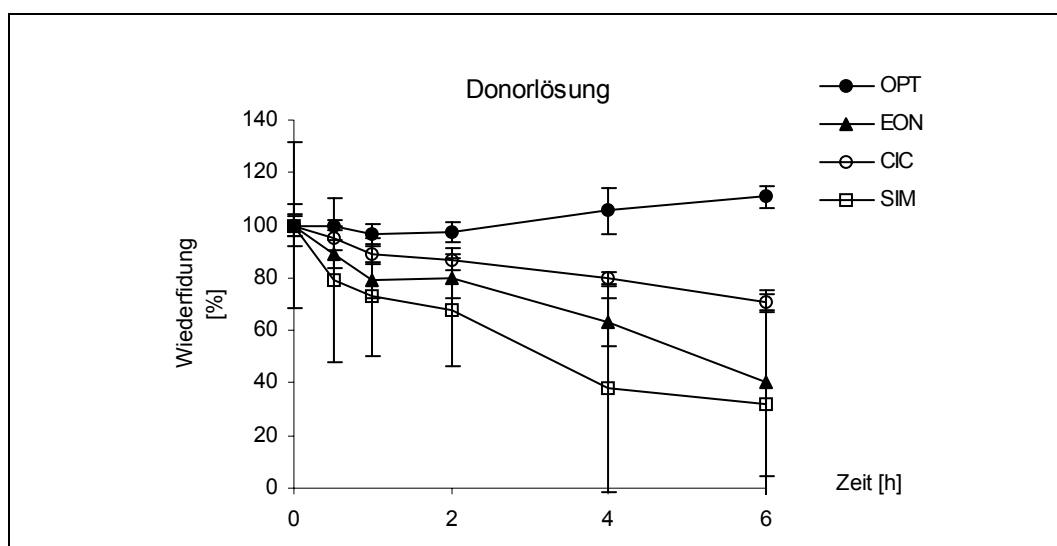


Abbildung 23: Prozentuale Wiederfindung von Ciclosporin aus gelösten Kapseln in der Donorlösung des Organbads (ohne Ileum) als indirektes Maß für die Adsorption von CsA an Glasoberflächen. OPT = Sandimmun® Optoral, EON = Cyclosporine Capsules, CIC = Cicloral®, SIM = Sandimmun® ( $MW \pm SEM$ ,  $n = 5$ ).

### 4.3 Adsorption von Ciclosporin aus Ciclosporin-Lösungen an Glasoberflächen

Die in Wasser verdünnten Lösungen von OPT und CIC zeigten übereinstimmend einen, mit geringen Schwankungen, konstanten Verlauf der Wiederfindung von Ciclosporin in

Trinkgläsern. Nach 2 h lagen die Konzentrationen im Bereich des Ausgangswertes von 1,5 mg/ml.

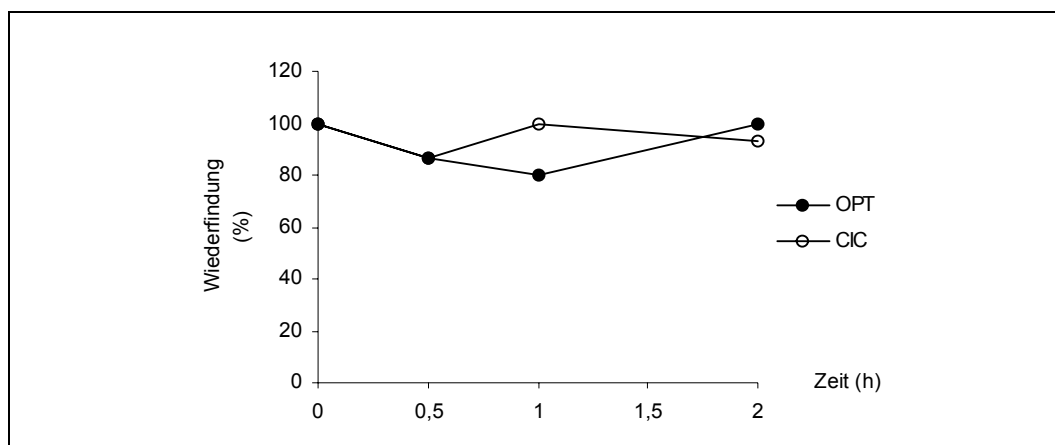


Abbildung 24: Prozentuale Wiederfindung von Ciclosporin aus CsA-Lösungen in Trinkgläsern als indirektes Maß für die Adsorption von CsA an Glasoberflächen. OPT = Sandimmun® Optoral Lösung, CIC = Cicloral® Lösung (MW  $\pm$  SEM, n = 4).

#### 4.4 Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus, in Wasser bzw. Olivenöl gelösten Cyclosporine Capsules (EonLabs) und Sandimmun® Optoral Kapseln (Novartis) bei Ratten unter steady-state Bedingungen

##### 4.4.1 Bestimmung des Zeitraums bis zum Erreichen von steady-state Bedingungen

Bei einer Dosierung von 10 mg/kg/d wurden bei WKY-Ratten nach einem Tag Ciclosporin-Talspiegel von ca. 400 ng/ml erreicht, die bis zum Tag 3 auf ca. 750 ng/ml anstiegen. Nach konstantem Verlauf bis Tag 5 zeigte sich ein nochmaliger Anstieg am Tag 7 auf ca. 900 ng/ml. Im Nierenkortex erhöhten sich die Konzentrationen von ca. 6 µg/g am Tag 1 auf ca. 10 µg/g an den Tagen 3 und 5. Nach einer Woche lag der Wert bei etwa 9 µg/g.

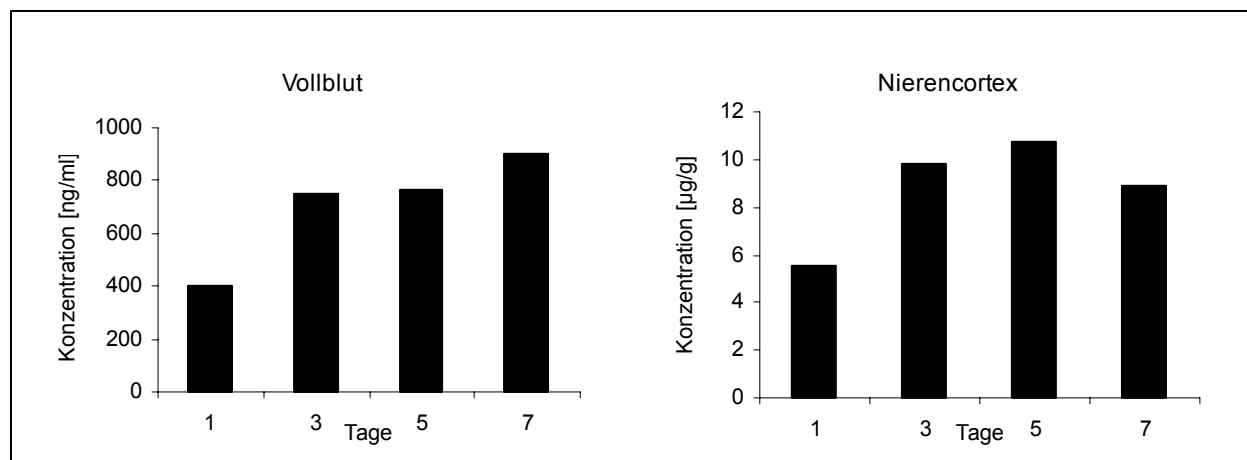


Abbildung 25: Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ciclosporin im Vollblut (ng/ml) und Nierenkortex (µg/g) bei WKY-Ratten. Dosis: 10 mg/kg/d CsA (MW, n = 3).

#### 4.4.2 Bioverfügbarkeit von Ciclosporin

Abbildung 26 zeigt den Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ciclosporin im Vollblut von WKY-Ratten nach sechsmaliger Applikation von 10 mg/kg/d Ciclosporin per Schlundsonde. Sowohl bei EON als auch bei OPT lagen die Konzentrationen von Ciclosporin nach Gabe von in Wasser gelösten Kapseln zu jedem Messzeitpunkt höher als nach Lösen in Olivenöl. Bei EON waren die Unterschiede zwischen in Wasser (EON-w) und in Öl (EON-öl) gelösten Kapseln zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 h signifikant, bei OPT war dies zu allen Messpunkten der Fall.

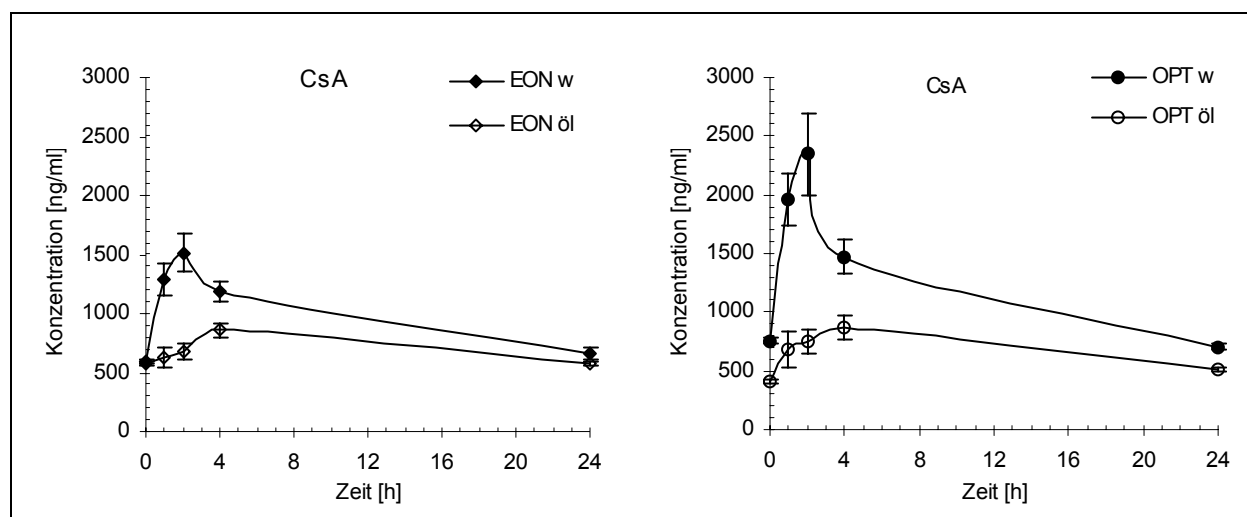


Abbildung 26: Mittelwert des Konzentrations-Zeit-Verlaufs von Ciclosporin im Vollblut von WKY-Ratten nach sechsmaliger Applikation von 10 mg/kg/d CsA. EON = Cyclosporine Capsules, OPT = Sandimmun® Optoral, w = Kapseln gelöst in Wasser, öl = Kapseln gelöst in Olivenöl (MW  $\pm$  SEM, n = 4).

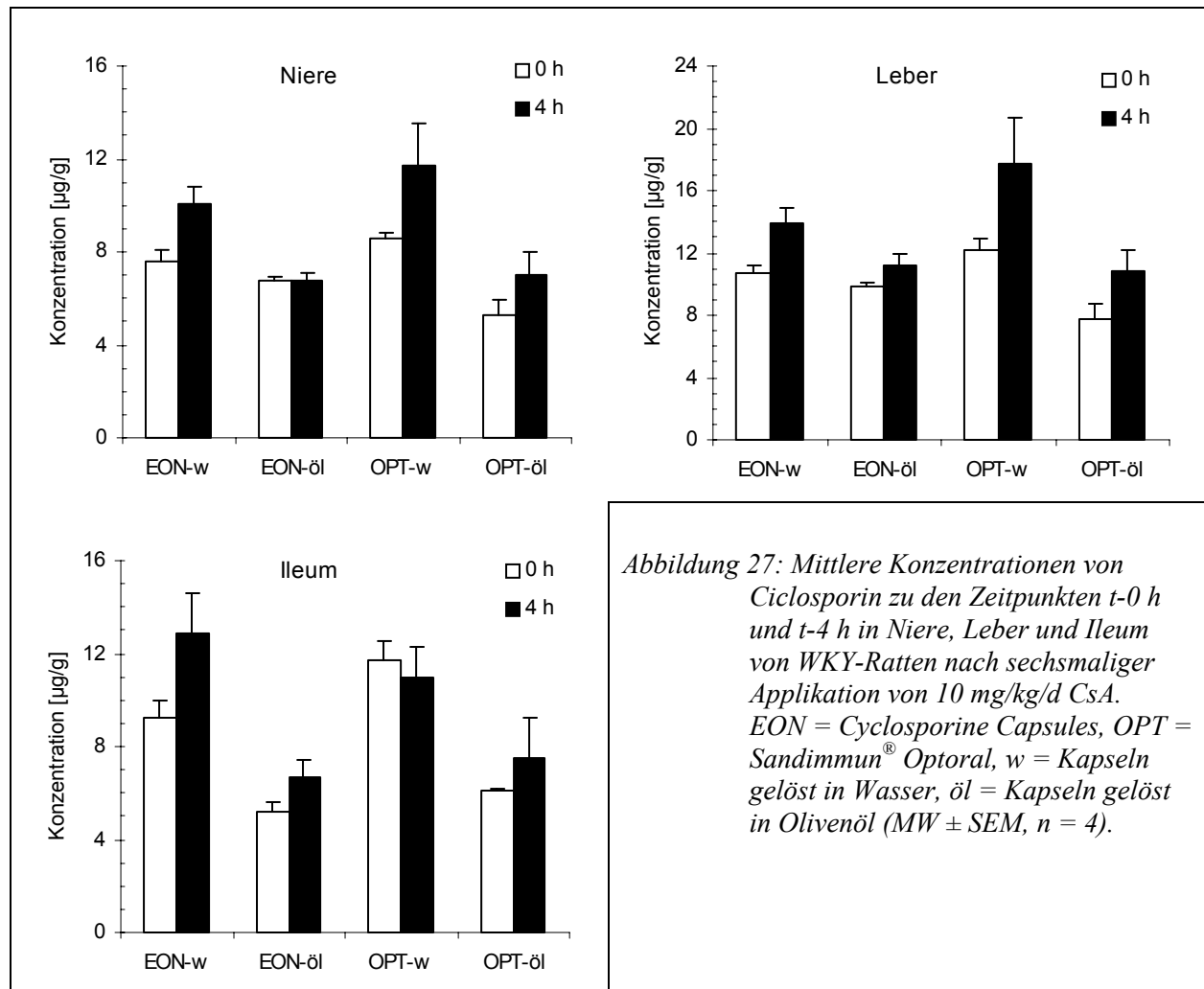
Die mittleren Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) bei EON betrugen ca. 1530 (EON-w) vs. 860 ng/ml (EON-öl). Die Fläche unter der Kurve ( $AUC_{0-4h}$ ) ergab im Mittel bei EON-w etwa 5050 gegenüber 2800 ng/ml\*h bei EON-öl. Die Zeit bis zum Erreichen von  $C_{\max}$  ( $t_{\max}$ ) war bei EON-w mit 1,8 vs. 4,0 h deutlich kürzer. Die Unterschiede für die Parameter AUC und  $C_{\max}$  waren signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei OPT waren die mittleren Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) nach Applikation von in Wasser gelösten Kapseln mit ca. 2350 vs. 870 ng/ml (in Öl gelöst) signifikant höher. Auch die  $AUC_{0-4h}$  lag bei OPT-w mit ca. 7000 vs. 2900 ng/ml\*h signifikant über der von OPT-öl.  $C_{\max}$  wurde bei OPT-w nach 2,0 h und damit in der Hälfte der Zeit von OPT-öl erreicht. Beim Vergleich von EON-w mit OPT-w lagen bei letzterem die Ciclosporin-Konzentrationen zu den Zeitpunkten 0 und 1 h signifikant höher. Für die Parameter  $C_{\max}$  ( $p = 0,07$ ) und  $AUC_{0-4h}$  ( $p = 0,06$ ) zeigte sich ein deutlicher Trend zu höheren Werten bei OPT-w. Zwischen EON-öl und OPT-öl war nur in den Ciclosporin-Spiegeln zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h ein signifikanter Unterschied festzustellen.

Tabelle 11: Pharmakokinetische Parameter von Ciclosporin bei WKY-Ratten nach sechsmaliger Applikation von 10 mg/kg/d CsA. EON = Cyclosporine Capsules, OPT = Sandimmun® Optoral, w = Kapseln gelöst in Wasser, öl = Kapseln gelöst in Olivenöl (MW  $\pm$  SEM, n = 4).

	EON w	EON öl	OPT w	OPT öl
$C_{\max}$ (ng/ml)	1531 $\pm$ 333	857 $\pm$ 123	2347 $\pm$ 694	869 $\pm$ 203
$t_{\max}$ (h)	1,8 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 0,0
$AUC_{0-4h}$ (ng/ml*h)	5050 $\pm$ 888	2793 $\pm$ 361	6955 $\pm$ 1360	2875 $\pm$ 772

### Bioverfügbarkeit von Ciclosporin in Niere, Leber und Ileum

In der Niere und der Leber waren die höchsten Ciclosporin-Spiegel zwei Stunden nach Applikation von in Wasser gelösten Sandimmun® Optoral-Kapseln (OPT-w) festzustellen, im Ileum war dies bei EON-w der Fall. Der Vergleich von EON-w mit EON-öl erbrachte signifikante Unterschiede bei 0 h in der Niere und bei 0 h und 4 h im Ileum. Bei OPT-w waren die Ciclosporin-Spiegel in Niere und Ileum jeweils bei 0 h signifikant höher als bei OPT-öl. In der Leber wie auch beim Vergleich von EON-w mit OPT-w und EON-öl mit OPT-öl waren keine signifikanten Abweichungen erkennbar.





#### 4.4.3 Metabolisierung von Ciclosporin

Bei der Metabolisierung von Ciclosporin zu AM1 und AM9 zeigte sich eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität und damit verbunden ein sehr uneinheitlicher und zum Teil ungewöhnlicher mittlerer Konzentrations-Zeit-Verlauf. Die Spiegel des Metaboliten AM1 im Vollblut der Ratten unterschieden sich dabei zu keiner Zeit signifikant.

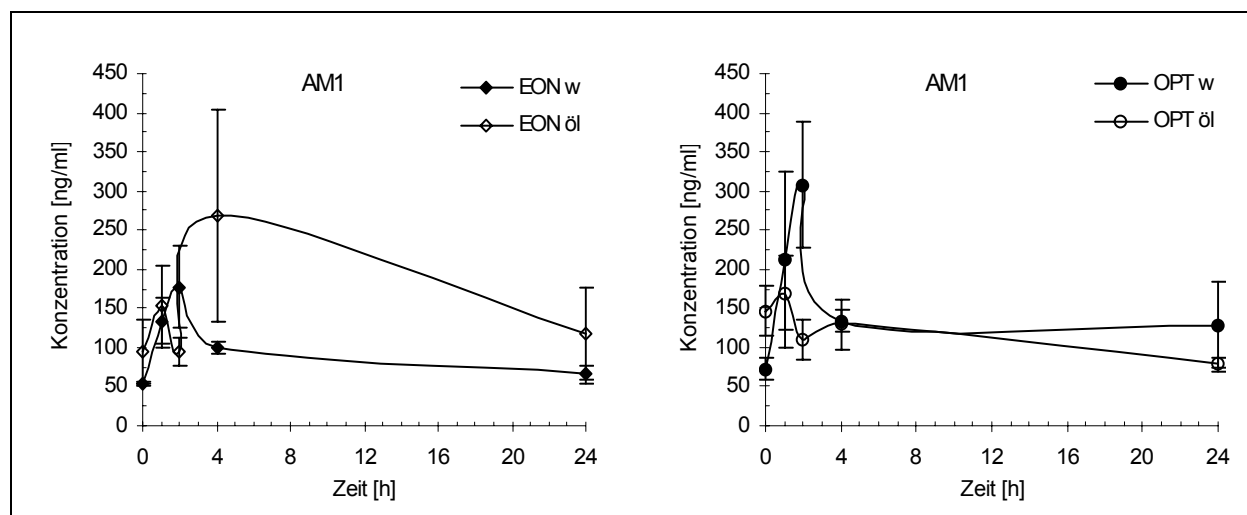


Abbildung 28: Mittelwert des Konzentrations-Zeit-Verlaufs von AM1 im Vollblut von WKY-Ratten nach sechsmaliger Applikation von 10 mg/kg/d CsA. EON = Cyclosporine Capsules, OPT = Sandimmun® Optoral, w = Kapseln gelöst in Wasser, öl = Kapseln gelöst in Olivenöl (MW  $\pm$  SEM, n = 4).

Die mittleren Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) lagen bei EON-öl höher als bei EON-w (330 vs. 200 ng/ml), während bei OPT der größere Wert nach Applikation von in Wasser gelösten Kapseln resultierte (428 vs. 216 ng/ml). Diese Relation galt auch für die  $AUC_{0-4h}$ , mit 530 vs. 610 ng/ml\*h bei EON und 810 vs. 540 ng/ml\*h bei OPT.  $C_{\max}$  und  $AUC_{0-4h}$  waren bei OPT-w signifikant höher als bei OPT-öl bzw. bei OPT-w höher als bei EON-w.

Tabelle 12: Pharmakokinetische Parameter von AM1 bei WKY-Ratten nach sechsmaliger Applikation von 10 mg/kg/d CsA. EON = Cyclosporine Capsules, OPT = Sandimmun® Optoral, w = Kapseln gelöst in Wasser, öl = Kapseln gelöst in Olivenöl (MW  $\pm$  SEM, n = 4).

	EON w	EON öl	OPT w	OPT öl
$C_{\max}$ (ng/ml)	200 $\pm$ 102	333 $\pm$ 235	428 $\pm$ 116	216 $\pm$ 62
$t_{\max}$ (h)	1,5 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 2,1	1,8 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 1,0
$AUC_{0-4 h}$ (ng/ml*h)	525 $\pm$ 140	613 $\pm$ 274	810 $\pm$ 156	537 $\pm$ 140

Die Metabolisierung von Ciclosporin zu AM9 war bei OPT-w am ausgeprägtesten, während sich die drei anderen Testschemen im Konzentrations-Zeit-Verlauf ähnelten. Im Gegensatz zu AM1 waren die AM9-Spiegel zum Zeitpunkt 2 h jeweils bei EON-w vs. EON-öl, OPT-w vs. OPT-öl und OPT-w vs. EON-w signifikant erhöht.

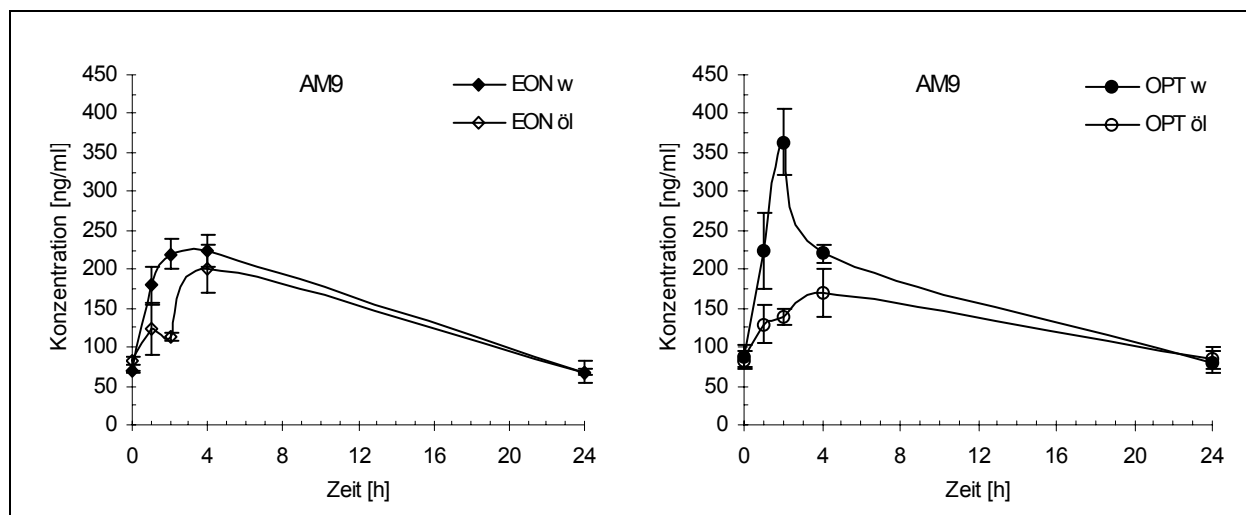


Abbildung 29: Mittelwert des Konzentrations-Zeit-Verlaufs von AM9 im Vollblut von WKY-Ratten nach sechsmaliger Applikation von 10 mg/kg/d CsA. EON = Cyclosporine Capsules, OPT = Sandimmun® Optoral, w = Kapseln gelöst in Wasser, öl = Kapseln gelöst in Olivenöl (MW  $\pm$  SEM, n = 4).

Wie in Tabelle 13 dargestellt, waren für  $C_{\max}$  und  $AUC_{0-4h}$  bei beiden Präparaten die höheren Werte nach Gabe von in Wasser gelösten Kapseln festzustellen. Die Maximalkonzentration wurde bei OPT mit ca. 2 h früher als bei EON (ca. 3 h) erreicht.

Signifikante Unterschiede in den Parametern  $C_{\max}$  und  $AUC_{0-4h}$  waren bei OPT-w vs. OPT-öl und OPT-w vs. EON-w zu verzeichnen, für  $AUC_{0-4h}$  zusätzlich noch bei EON-w vs. EON-öl.

Tabelle 13: Pharmakokinetische Parameter von AM9 bei WKY-Ratten nach sechsmaliger Applikation von 10 mg/kg/d CsA. EON = Cyclosporine Capsules, OPT = Sandimmun® Optoral, w = Kapseln gelöst in Wasser, öl = Kapseln gelöst in Olivenöl (MW  $\pm$  SEM, n = 4).

	EON w	EON öl	OPT w	OPT öl
$C_{\max}$ (ng/ml)	262 $\pm$ 24	206 $\pm$ 62	372 $\pm$ 83	183 $\pm$ 55
$t_{\max}$ (h)	3,0 $\pm$ 1,2	3,3 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 1,3
$AUC_{0-4 h}$ (ng/ml*h)	766 $\pm$ 134	535 $\pm$ 117	978 $\pm$ 101	551 $\pm$ 101

#### 4.5 Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cicloral® bei gesunden Probanden – Einnahme nach fettreichem Frühstück vs. Nüchternapplikation

Studiencode: CIC-BV-1

##### 4.5.1 Probandenpopulation

An der Studie nahmen zwölf männliche Probanden im Alter von 23 – 28 Jahren (Median 26 Jahre), einem Körpergewicht von 67 – 82 kg (Median 73 kg) und einer Körpergröße von 175 – 188 cm (Median 180 cm) teil. Der Broca-Index lag bei 0,79 – 1,05 (Median 0,90). Der Broca-Index eines Probanden (Nr. 3) lag mit 0,79 geringfügig unterhalb der im Protokoll vorgesehenen Grenze von 0,80. Dies wurde aber vom Prüfarzt als nicht klinisch relevant eingeschätzt. Fünf

Probanden waren Raucher (bis 20 Zigaretten/Tag), drei davon rauchten aber nur gelegentlich oder weniger als zehn Zigaretten/Tag. Die Probanden waren Studenten, Diplomanden und Doktoranden der Universität Regensburg, vorwiegend der Fächer Chemie, Pharmazie und Medizin.

Es wurde kein Proband vorzeitig aus der Studie ausgeschlossen und keiner brach diese ab.

#### **4.5.2 Anamnese**

Die Probanden wurden innerhalb von zwei Wochen vor Versuchsbeginn körperlich untersucht. Hierbei ergaben sich keine Anhaltspunkte für klinisch relevante Abweichungen von der Norm. Bei der Anamneseerhebung wurden keine Erkrankungen festgestellt, die auf das Versuchsergebnis hätten Einfluss nehmen können.

#### **4.5.3 Laborbefund**

Die im Prüfplan festgelegten Serum- und Urinparameter wurden vor Beginn und nach Ende der Studie untersucht. Die laborchemischen Untersuchungen wurden durch das Institut für Klinische Chemie der Universität Regensburg durchgeführt, die Untersuchung des Urins am Lehrstuhl für Pharmakologie der Universität Regensburg. Es wurden nur Teilnehmer mit Laborparametern im Normalbereich oder nach Urteil des Prüfarztes klinisch nicht relevanten Abweichungen eingeschlossen.

#### **4.5.4 Vormedikation**

Eine regelmäßige Medikamenteneinnahme lag bei keinem Probanden vor.

#### **4.5.5 Protokolleinhaltung**

Zeitliche Durchführung

Der Abstand zwischen den beiden Kinetiktagen betrug bei elf von zwölf Probanden sieben Tage, ein Proband (Nr. 9) absolvierte die Periode 2 wegen einer interkurrenten Erkrankung erst nach 27 Tagen. Alle Probanden beendeten die Studie ordnungsgemäß.

#### **4.5.6 Randomisierung und Behandlung**

Das Behandlungsschema wurde nach einem Randomplan verteilt. Die Probanden erhielten bei der Voruntersuchung eine Screening-Nummer, die Random-Nummer wurde anschließend zugelost. Die Probanden wurden im folgenden unter dieser Nummer geführt.

Ersatzprobanden erhielten die Nummer des Probanden, den sie ersetzen.

Abweichungen vom Blutabnahmezeitplan

Die Blut- bzw. Plasmakonzentrationen von Ciclosporin, dessen Metaboliten, Cortisol und Cortison wurden über 48 Stunden analysiert. Um die Blutentnahmen nicht minutiös eintragen zu müssen, wurde eine Toleranz zwischen Soll- und Ist-Zeit eingeführt, die sich am Abstand zur Medikationseinnahme, dem Abstand zwischen benachbarten Messzeiten und der geschätzten Steigung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve orientierte. Lag der Blutabnahmezeitpunkt (Ist-Zeit) innerhalb der Toleranz, so wurde die Abnahme lediglich durch Abhaken im CRF dokumentiert. Lag er außerhalb, so wurde die Abweichung von der Soll-Zeit in Minuten eingetragen. Die Toleranzgrenzen waren so eng bemessen, dass Verstöße gegenüber der Soll-

Zeit innerhalb der Toleranz auf keinen Fall messbare Auswirkungen auf die pharmakokinetischen Parameter ( $AUC$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ) haben konnten.

In zehn Fällen lag der Entnahmezeitpunkt außerhalb des tolerierten Zeitfensters. Die Abweichungen waren in acht Fällen geringfügig und nahmen keinen spürbaren Einfluss auf die pharmakokinetischen Zielgrößen. Diese wurden folglich mit dem theoretischen Zeitplan berechnet. Bei einem Probanden (Nr. 12) wurden aufgrund von Undurchgängigkeit der Verweilkanüle in Periode 2 die Entnahmezeitpunkte 0,5 h um 17 min und 2,5 h um 16 min überschritten. In diesen beiden Fällen wurde nicht mit dem Sollzeitplan, sondern mit den tatsächlichen Entnahmezeitpunkten gerechnet.

#### Probandengruppen der Analyse

Es wurden die pharmakokinetischen und –dynamischen Daten aller zwölf Probanden ausgewertet.

#### 4.5.7 Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cicloral® Kapseln

Abbildung 30 zeigt den Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ciclosporin im Vollblut nach Applikation von zwei Kapseln Cicloral® mit je 100 mg Wirkstoff nach fettreichem Frühstück und nach Nüchterneinnahme. Die Blutkonzentrations-Zeit-Kurven sind nur bis 24 Stunden nach Applikation dargestellt, da die Ciclosporin-Konzentrationen zu den späteren Messzeitpunkten mehrheitlich unter der Bestimmungsgrenze von 15 ng/ml lagen.

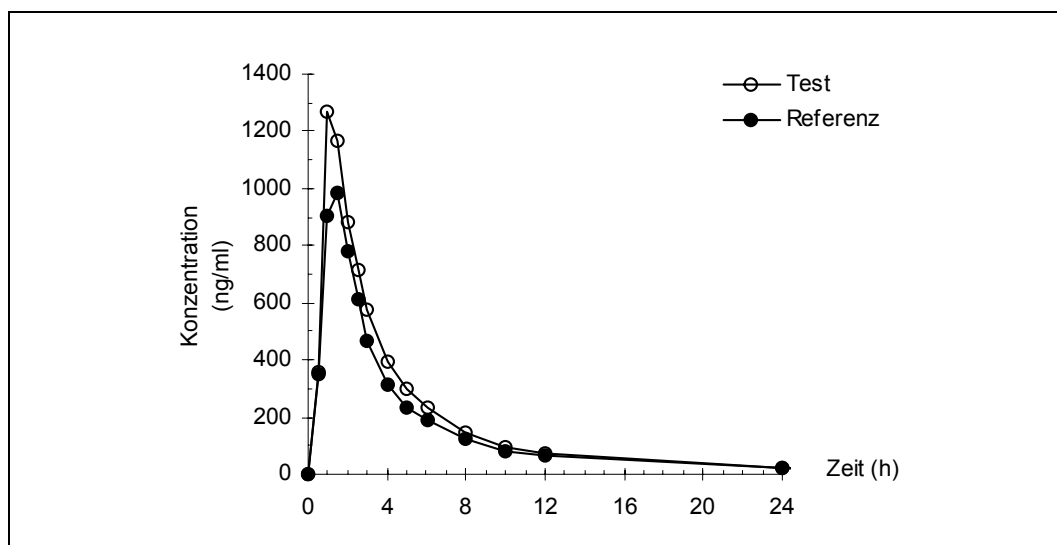


Abbildung 30: Mittelwert des Konzentrations-Zeit-Verlaufs von Ciclosporin im Vollblut von zwölf Probanden nach oraler Applikation von zwei Kapseln Cicloral® mit je 100 mg Wirkstoff nach fettreichem Frühstück (Test) vs. Nüchterneinnahme (Referenz)

Bei Einnahme nach fettreichem Frühstück (Test) lagen die mittleren Konzentrationen von Ciclosporin zu jedem Messzeitpunkt höher als bei Nüchterneinnahme (Referenz). Die Unterschiede waren bis auf die Zeitpunkte 0,5 h, 1,5 h und 12 h signifikant ( $p < 0,05$ ).

#### Pharmakokinetische Parameter

Die pharmakokinetischen Parameter von Ciclosporin sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Pharmakokinetische Parameter von Ciclosporin nach oraler Applikation von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup> mit je 100 mg Wirkstoff nach einem fettreichen Frühstück (Test) bzw. nach Nüchterneinnahme (Referenz)

	Nach dem Frühstück (Test)			Nüchtern (Referenz)		
	MW $\pm$ SD	Min	Max	MW $\pm$ SD	Min	Max
$C_{\max}$ (ng/ml)	1366 $\pm$ 380	681	2174	1031 $\pm$ 126	905	1340
$t_{\max}$ (h)	1,25 $\pm$ 0,45	1,0	2,5	1,38 $\pm$ 0,23	1,0	1,5
$t_{1/2}$ (h)	7,1 $\pm$ 1,5	3,5	9,4	6,9 $\pm$ 1,2	3,7	8,1
$AUC_{0-t_{\text{last}}}$ (ng/ml*h)	4756 $\pm$ 979	3258	6949	3921 $\pm$ 620	3083	5268
$AUC_{0-\infty}$ (ng/ml*h)	5026 $\pm$ 1008	3391	7183	4137 $\pm$ 633	3314	5474
$AUC_{t_{\text{last}}-\infty}$ (% $AUC_{\infty}$ )	5,4 $\pm$ 1,1	3,3	7,2	5,3 $\pm$ 1,1	3,8	7,0

Im Testschema war die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin höher als im Referenzschema. Die mittleren Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) betrugen ca. 1370 (Test) vs. 1030 ng/ml (Referenz). Entgegen diesem allgemeinen Trend war bei zwei Probanden die Maximalkonzentration bei Nüchterneinnahme erhöht. Dies waren Proband 1 (681 vs. 1070 ng/ml) und Proband 11 (1011 vs. 1031 ng/ml)(siehe Abbildung 31).

Die Fläche unter der Kurve ( $AUC_{0-\infty}$ ) ergab im Test etwa 5000 gegenüber 4100 ng/ml\*h in der Referenz. Hier war eine Erhöhung von Referenz gegenüber Test nur bei Proband 1 (3391 vs. 4406 ng/ml\*h) zu verzeichnen. Bei zwei Probanden (Nr. 6 und Nr. 12) blieb die AUC mit einem Anstieg von weniger als 3 % im Testschema relativ konstant (siehe Abbildung 31). Die Restfläche vom letzten Messzeitpunkt nach Unendlich ( $AUC_{t_{\text{last}}-\infty}$ ) lag mit weniger als 6 % deutlich unter der geforderten Grenze von 20 % (Blume und Mutschler 1989). Somit war das Messintervall für die Blutentnahmen ausreichend lange gewählt.

Die Zeit bis zum Erreichen von  $C_{\max}$  ( $t_{\max}$ ) war mit 1,25 h vs. 1,38 h tendenziell kürzer. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  gab bei beiden Applikationsarten mit 7,1 h vs. 6,9 h ein einheitliches Bild ab. Die Unterschiede zwischen Test und Referenz waren für die Parameter AUC und  $C_{\max}$  signifikant ( $p < 0,05$ ).

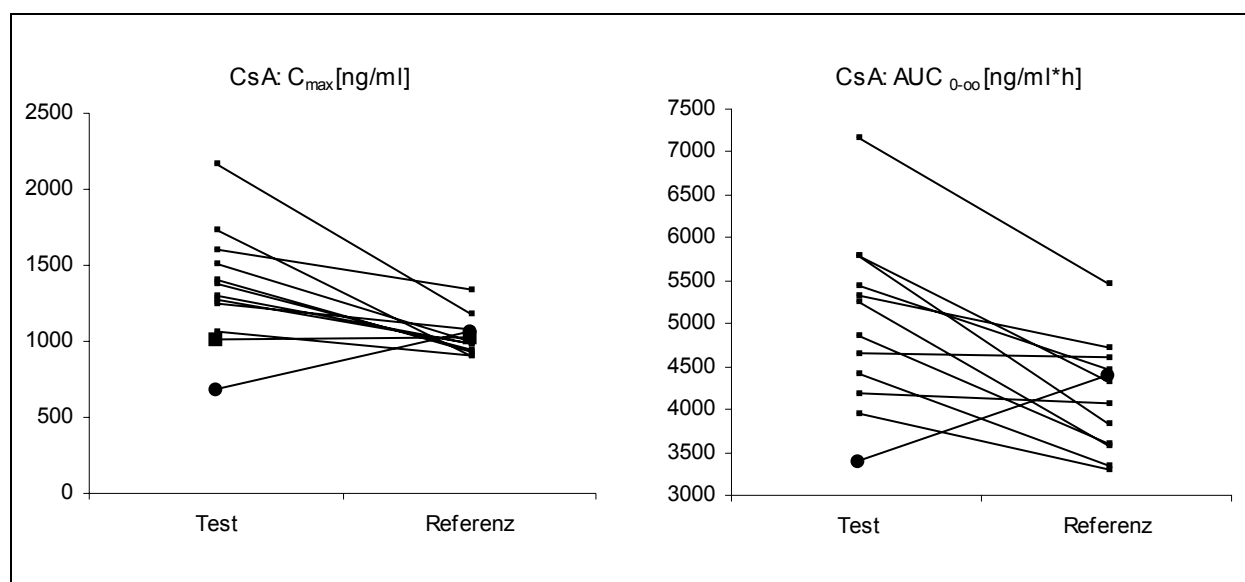
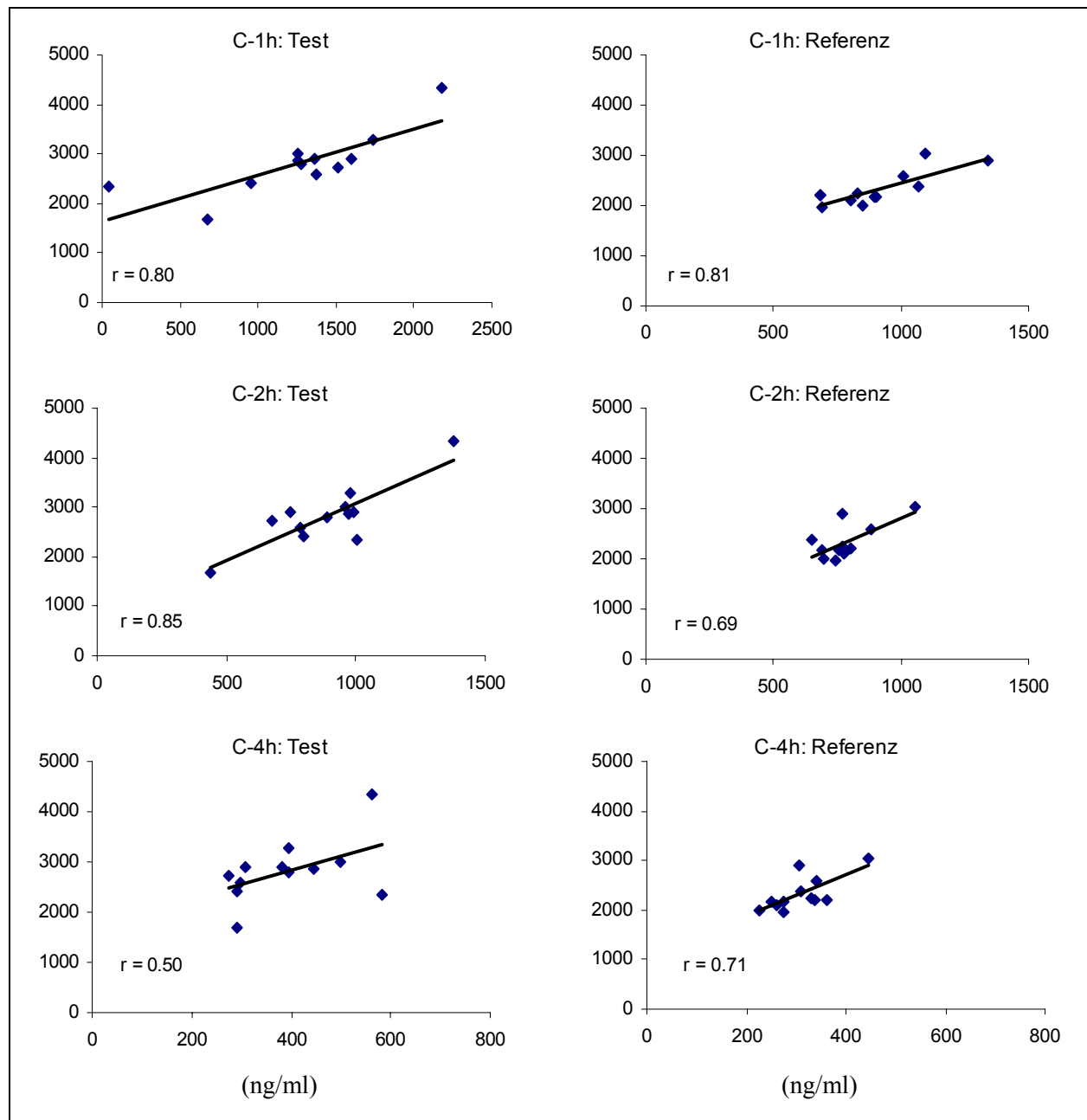


Abbildung 31: Veränderung der pharmakokinetischen Parameter  $C_{\max}$  und  $AUC_{0-\infty}$  nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup> mit je 100 mg Wirkstoff nach fettreichem Frühstück (Test) bzw. nüchtern (Referenz). Proband 1 ist mit ● markiert, Proband 11 mit ■ (nur linkes Bild).

### Korrelation zwischen einzelnen Ciclosporin-Spiegeln und der $AUC_{0-4h}$

Die Korrelation zwischen Ciclosporin-Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten und der  $AUC_{0-4h}$  ist in Abbildung 32 dargestellt. Die beste Korrelation bei Nüchterneinnahme von Ciclosporin zeigte sich bei C-1h ( $r = 0,81$ ), gefolgt von C-4h ( $r = 0,71$ ), C-2h ( $r = 0,69$ ) und C-12h ( $r = 0,49$ ). Bei Applikation von Cicloral<sup>®</sup> nach fettreichem Frühstück ergaben sich folgende Korrelationen: C-2h ( $r = 0,85$ ), C-1h ( $r = 0,80$ ), C-12h ( $r = 0,54$ ) und C-4h ( $r = 0,50$ ).

Der C-12h Wert entspräche dem Talspiegel (C-0h) des typischen Dosierungsintervalls von 12 h in der Dauertherapie.



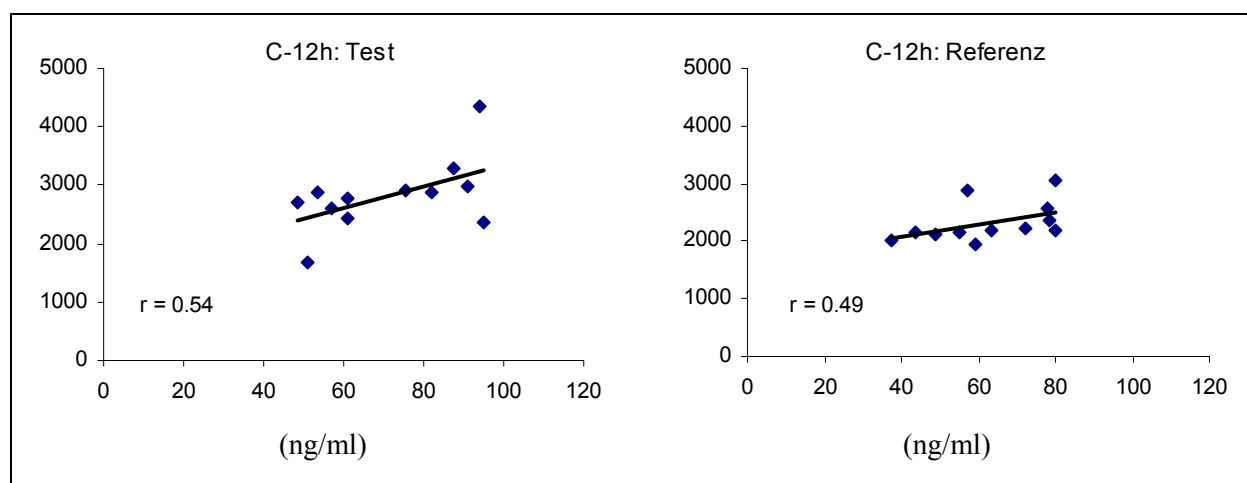


Abbildung 32: Korrelationen zwischen CsA-Spiegeln (ng/ml) und der AUC<sub>0-4h</sub> (ng/ml\*h) nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral®, entsprechend 200 mg CsA bei zwölf Probanden.  
Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern.

#### Vergleich der Bioverfügbarkeit

Bei Einnahme von Cicloral® nach einem fettreichen Frühstück waren die mittleren Maximalkonzentrationen von Ciclosporin etwa 30 % und die mittlere Bioverfügbarkeit, gemessen an der AUC, um ca. 20 % höher als bei Nüchterneinnahme. Zwischen beiden Applikationsarten konnte Bioäquivalenz nicht nachgewiesen werden. Die Werte für  $t_{\max}$  waren nicht signifikant verschieden. Das 90%-Konfidenzintervall beinhaltete in beiden Fällen den Wert 'Null'.

Tabelle 15: Bioäquivalenzdaten von Cicloral® bei zwölf Probanden nach Einnahme von zwei Kapseln mit je 100 mg Wirkstoff nach fettreichem Frühstück vs. Nüchterneinnahme.

	Test	Punktschätzer	90%-Konfidenzintervall	Bioäquivalenzbereich
$C_{\max}$ (ng/ml)	t-Test	1,28	1,15 – 1,43	0,80 – 1,25
	Wilcoxon-Test	1,32	1,20 – 1,46	
$t_{\max}$ (h)	Wilcoxon-Test	-0,25	-0,25 – 0,00	
AUC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*h)	t-Test	1,21	1,12 – 1,30	0,80 – 1,25
	Wilcoxon-Test	1,22	1,12 – 1,31	

### 4.5.8 Metabolisierung von Ciclosporin

#### 4.5.8.1 Konzentrations-Zeitverlauf der Metaboliten AM1 und AM9 im Vollblut

Abbildung 33 zeigt den Konzentrations-Zeitverlauf von AM1 und AM9 im Vollblut nach Gabe von zwei Kapseln Cicloral® nach einem fettreichen Frühstück (Test) und nach Nüchterneinnahme (Referenz). Bei AM9 sind die Kurven nur bis 24 Stunden dargestellt, da die gemessenen Konzentrationen zu den späteren Zeitpunkten überwiegend unterhalb der Nachweisgrenze von 10 ng/ml lagen.

Beim Metaboliten AM1 waren nach Nüchterneinnahme gegenüber der Einnahme nach fettreichem Frühstück die mittleren Konzentrationen bis 2,5 Stunden höher, im weiteren Verlauf durchweg niedriger. Die Unterschiede zeigten zu keinem Zeitpunkt Signifikanz.

Bei AM9 ergibt sich ein ähnliches Bild, v.a. im Bereich von  $t_{\max}$  (2 – 2,5 h) lagen die mittleren Konzentrationen im Referenzschema höher, während sie anschließend wiederum niedriger als im Testschema waren. Zu den Zeitpunkten 8, 10 und 12 h waren die Unterschiede signifikant ( $p < 0,05$ ).

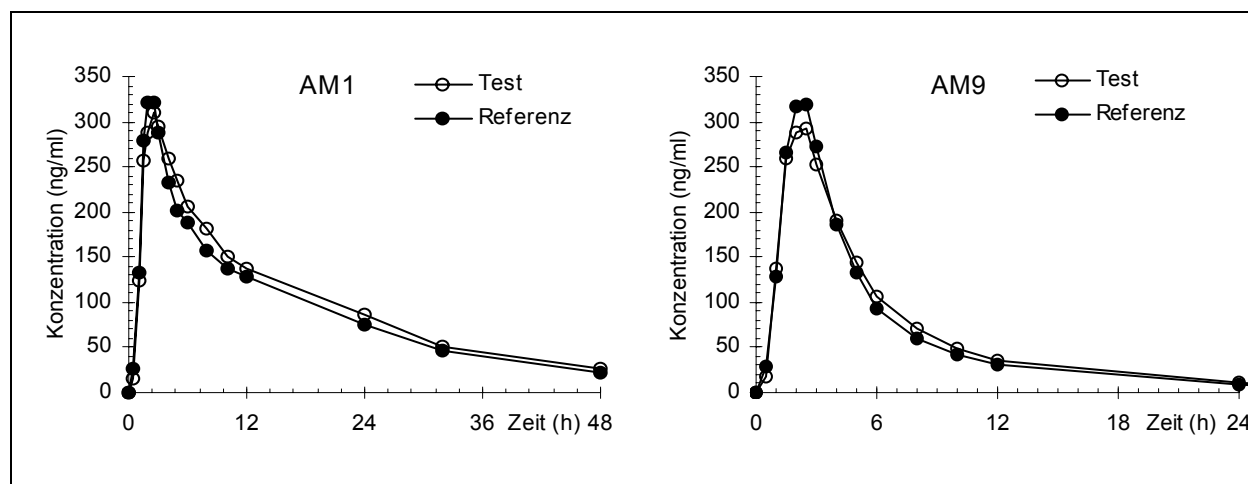


Abbildung 33: Mittelwert des Konzentrations-Zeit-Verlaufs der Metaboliten AM1 und AM9 im Vollblut von zwölf Probanden nach oraler Applikation von zwei Kapseln Cicloral® mit je 100 mg Wirkstoff nach fettreichem Frühstück (Test) vs. Nüchterneinnahme (Referenz).

#### Pharmakokinetische Parameter

Die mittleren Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) betrugen sowohl für AM1 als auch für AM9 ca. 317 (Test) vs. 333 ng/ml (Referenz).

Die Fläche unter der Kurve ( $AUC_{0-\infty}$ ) ergab bei AM1 im Test etwa 5400 gegenüber 4950 ng/ml\*h in der Referenz, bei AM9 ca. 1650 vs. 1600 ng/ml\*h. Die Restfläche vom letzten Messzeitpunkt nach Unendlich ( $AUC_{tlast-\infty}$ ) lag mit weniger als 13 % unter der geforderten Grenze von 20 % (Blume und Mutschler 1989). Die Zeit bis zum Erreichen von  $C_{\max}$  ( $t_{\max}$ ) war bei AM1 mit 2,38 h im Test vs. 2,21 h tendenziell kürzer. Bei AM9 lag  $t_{\max}$  konstant bei 2,25 h. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von AM1 ist mit ca. 15 h deutlich größer als die von AM9 (ca. 4 h).

Tabelle 16: Pharmakokinetische Parameter von AM1 und AM9 bei zwölf Probanden nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral®, entsprechend 200 mg CsA. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern (MW  $\pm$  SD).

	AM1		AM9	
	Test	Referenz	Test	Referenz
$C_{\max}$ (ng/ml)	321 $\pm$ 74	334 $\pm$ 60	314 $\pm$ 55	332 $\pm$ 48
$t_{\max}$ (h)	2,38 $\pm$ 0,53	2,21 $\pm$ 0,40	2,25 $\pm$ 0,72	2,25 $\pm$ 0,34
$t_{1/2}$ (h)	14,9 $\pm$ 1,3	14,6 $\pm$ 1,6	4,0 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 0,7
$AUC_{0-tlast}$ (ng/ml*h)	4829 $\pm$ 1149	4458 $\pm$ 853	1454 $\pm$ 179	1423 $\pm$ 183
$AUC_{0-\infty}$ (ng/ml*h)	5381 $\pm$ 1265	4948 $\pm$ 912	1664 $\pm$ 252	1604 $\pm$ 251
$AUC_{tlast-\infty}$ (% $AUC_{\infty}$ )	10,3 $\pm$ 1,8	10,0 $\pm$ 2,4	12,2 $\pm$ 4,1	10,9 $\pm$ 3,4



In Abbildung 34 ist die Metabolisierungsrate als Verhältnis der Vollblut-Maximalkonzentration des Metaboliten zur AUC von Ciclosporin dargestellt. Die Metabolisierungsrate von AM1 und AM9 war im Referenzschema signifikant höher als bei Einnahme von CIC nach fettreichem Frühstück.

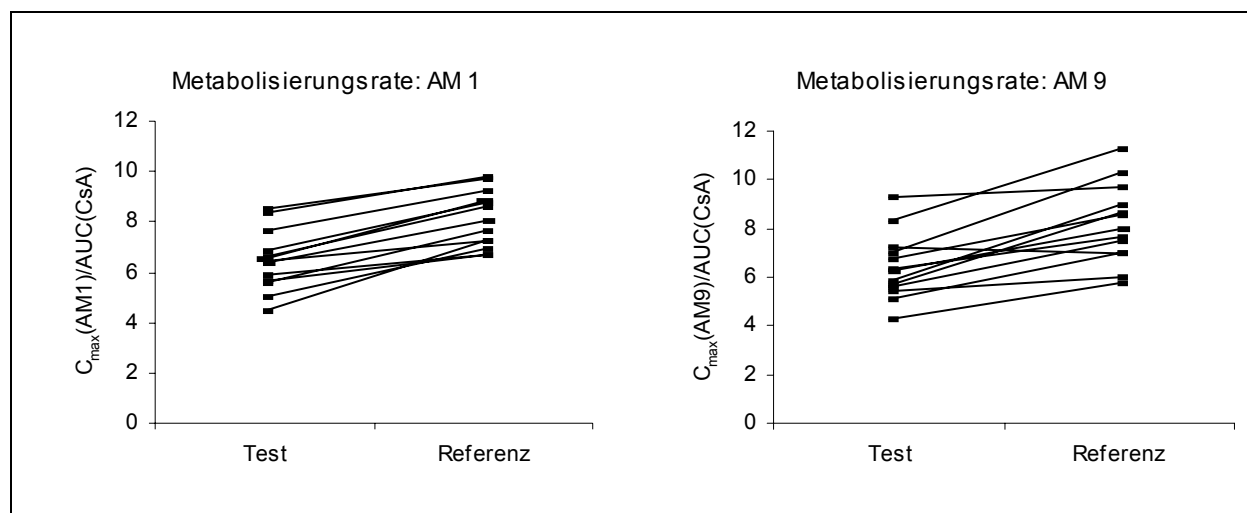


Abbildung 34: Metabolisierungsrate von AM1 und AM9 nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup>, entsprechend 200 mg CsA, bei zwölf Probanden, dargestellt als  $C_{\max}(AM) / AUC(CsA)$ . Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern.

Die Unterschiede zwischen Test und Referenz waren bei AM1 und AM9 für keinen der pharmakokinetischen Parameter signifikant. Die 90%-Konfidenzintervalle lagen sowohl für AUC als auch  $C_{\max}$  innerhalb der Bioäquivalenzgrenzen von 0,80 – 1,25.

Der Metabolit AM1c war im Vollblut nur sehr sporadisch nachzuweisen. Die Quantifizierung des Metaboliten AM4N gelang aufgrund interferierender Substanzen in den Vollblutproben nicht.

	Test	Punktschätzer		90%-Konfidenzintervall		Bioäquivalenz-Bereich	
		AM1	AM9	AM1	AM9	AM1	AM9
$C_{\max}$ (ng/ml)	t-Test	0,95	0,94	0,88 – 1,03	0,87 – 1,01	0,80 – 1,25	
	Wilcoxon	0,95	0,94	0,89 – 1,03	0,89 – 0,98		
$t_{\max}$ (h)	Wilcoxon	0,25	-0,25	0,00 – 0,50	-0,25 – 0,00	0,80 – 1,25	
$AUC_{0-\infty}$ (ng/ml*h)	t-Test	1,08	1,04	0,96 – 1,20	0,99 – 1,09		
	Wilcoxon	1,09	1,02	0,95 – 1,22	0,99 – 1,10		

Abbildung 35: Bioäquivalenzdaten von AM1 und AM9 bei zwölf Probanden nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup> mit je 100 mg Wirkstoff nach fettreichem Frühstück bzw. nüchtern.

#### 4.5.8.2 Konzentrations-Zeitverlauf von Ciclosporin, AM1, AM9 und AM1c im Urin

In Abbildung 36 sind die mittleren kumulativen Wiederfindungen von CsA, AM1, AM9 und AM1c im Urin dargestellt. Entsprechend der höheren Bioverfügbarkeit von CsA im Vollblut bei Einnahme nach fettreichem Frühstück überwog im Urin die Wiederfindung der Muttersubstanz ebenfalls zu allen Zeitpunkten gegenüber der Nüchterneinnahme. Auch bei den Metaboliten AM1, AM9 und AM1c lag die Wiederfindung im Test permanent über der im Referenzschema. Der Metabolit AM1c, welcher im Vollblut nicht nachzuweisen war, hatte hierbei eine um ca. 50 % höhere Wiederfindung als AM9.

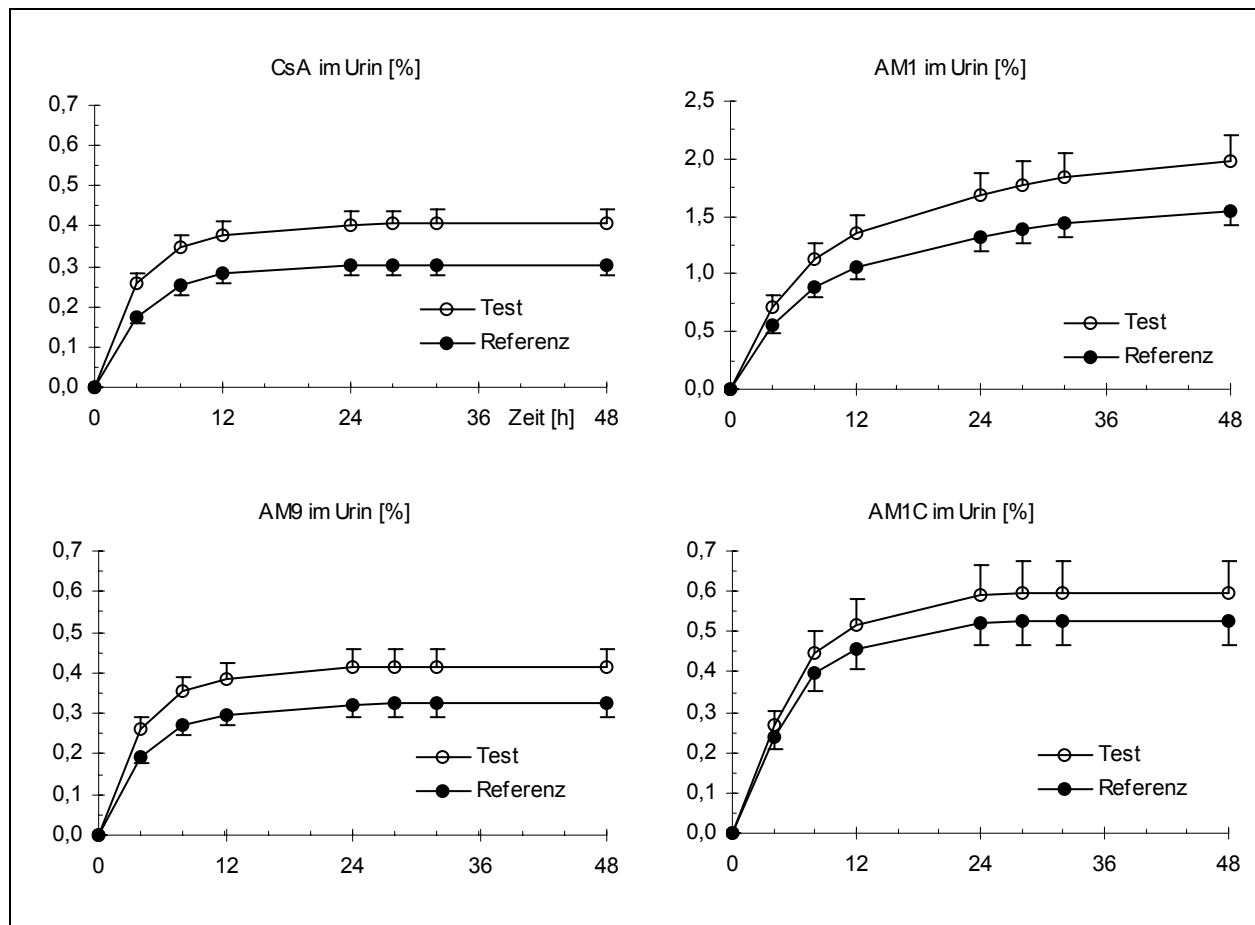


Abbildung 36: Mittlere kumulative Wiederfindung in % der CsA-Dosis von CsA, AM1, AM9 und AM1c im Urin von zwölf Probanden nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral®. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern.

Die Ausscheidung der Muttersubstanz im Urin war nach ca. 28 h abgeschlossen. In der Fraktion 28-32 h war bereits kein Ciclosporin mehr nachweisbar. Die Wiederfindung lag bei ungefähr 0,4 % (Test) vs. 0,3 % (Referenz) der Ausgangsdosis. Die Unterschiede waren in jeder Fraktion signifikant ( $p < 0,05$ ).

Beim Metaboliten AM1 lag die maximale Konzentration im Test nicht signifikant um etwa 25 % über jener der Referenz, jedoch war die Elimination auch nach 48 h noch nicht zu Ende.

Ein deutlicher Trend zu höheren Maximalkonzentrationen im Test (0,42 vs. 0,32 %) zeigt sich auch bei AM9, mit Signifikanz in der ersten Fraktion 0-4 h. Ab der Fraktion 24-28 h war kein AM9 im Urin zu finden. Bei AM1c waren mit ca. 0,6 vs. 0,5 % nur geringfügige Abweichungen

festzustellen. Die Ausscheidung erstreckte sich im Test über 28 h, während sie im Referenzschema bereits nach 24 h abgeschlossen war. Der Metabolit AM4N war im Urin nicht nachweisbar.

*Tabelle 17: Maximale kumulative Wiederfindung im Urin ( $C_{\max}$  kumul.) in % der CsA-Dosis (200 mg) und Zeit bis zur vollständigen Elimination ( $t_{\text{Elim}}$ ) von CsA, AM1, AM9 und AM1c bei zwölf Probanden. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück, Ref. = Referenz: Einnahme nüchtern.*

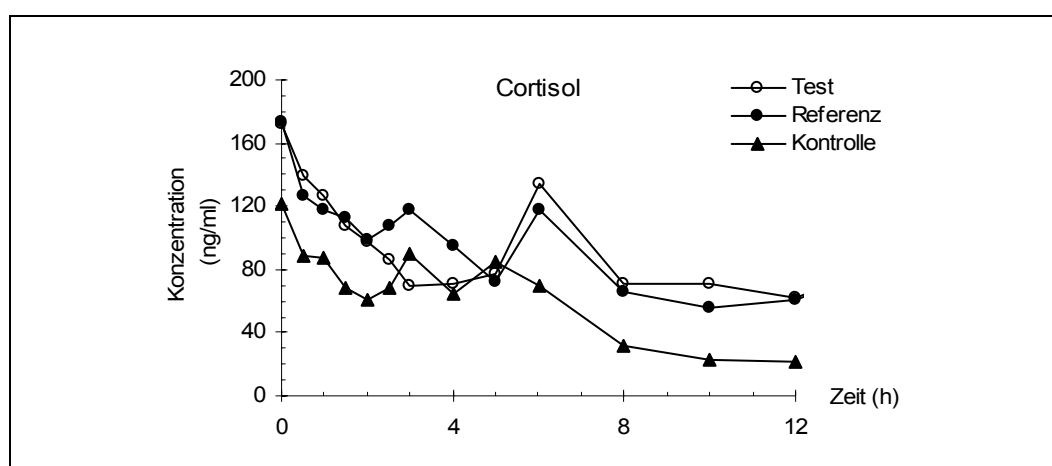
	CsA		AM1		AM9		AM1c	
	Test	Ref.	Test	Ref.	Test	Ref.	Test	Ref.
$C_{\max}$ kumul. (%)	0,41	0,30	> 1,98	> 1,55	0,42	0,32	0,60	0,52
$t_{\text{Elim}}$ (h)	28	24	> 48	> 48	24	24	28	24

#### 4.5.9 Plasmaspiegel von Cortisol und Cortison

Der Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf von Cortisol (CSL) zeigte bei Test und Referenz einen relativ einheitlichen Verlauf. Die absoluten Maxima lagen morgens um ca. 8:00 Uhr (t-0h bzw. – 24h), die absoluten Minima gegen 18:00 Uhr (t-10h) vor. Im Testschema waren zwischen 16:00 und 20:00 Uhr die Cortisolspiegel fast konstant, mit einem Minimum bei t-12h.

Die Cortisolspiegel fielen ausgehend von t-0h zunächst stetig ab, im Test bis t-3h. Im Referenzschema ergab sich ein Anstieg bereits ab t-2h, mit Wiederabsinken auf das Testniveau erst bei t-5h. Ab diesem Zeitpunkt war in beiden Schemata ein kurzer, deutlicher Anstieg der Konzentrationen zu verzeichnen. Ab t-6h zeigte sich eine kontinuierliche Spiegelreduktion bis in die Abendstunden.

Die Werte zu den Zeitpunkten 2,5, 3 und 4 h waren im Referenzschema signifikant höher als im Test.



*Abbildung 37: Plasmaspiegel von Cortisol nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup>, entsprechend 200 mg CsA, bei zwölf Probanden. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern; Kontrolle: Werte von 2 Probanden aus der Pilotstudie EON-CIC-BV-1.*

Der Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf des Cortisons verlief fast parallel zu dem des Cortisols, allerdings mit schwächer ausgeprägten Schwankungen. Das Maximum wurde ebenfalls am Morgen gegen 8:00 Uhr, das Minimum im Test um 20:00 Uhr, in der Referenz bereits um 18:00 Uhr erreicht. Bis zwei Stunden nach Einnahme der Medikation zeigten die Cortisonspiegel im

Referenzschema einen konstanten und im Vergleich zum Test erhöhten Verlauf. Die Unterschiede zu den Zeitpunkten 0,5 h und 1,5 h waren dabei signifikant.

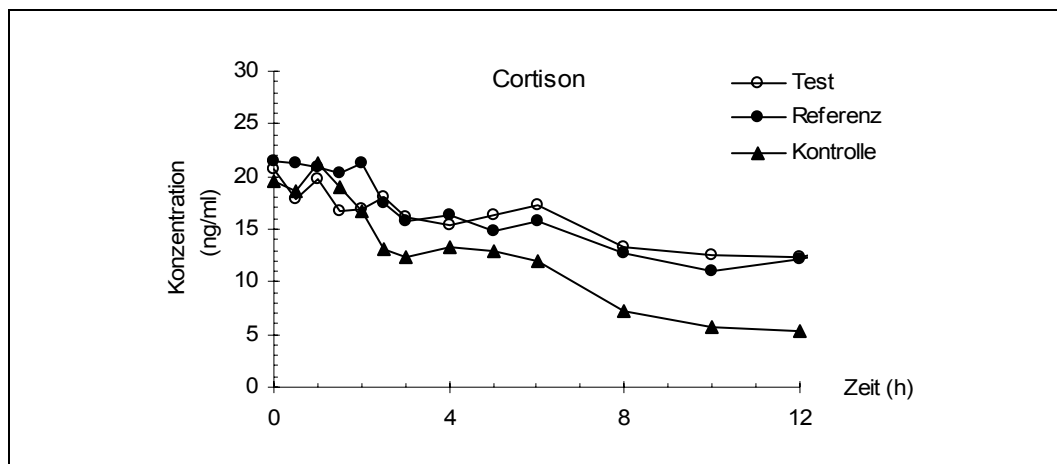


Abbildung 38: Plasmaspiegel von Cortison nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup>, entsprechend 200 mg CsA, bei zwölf Probanden. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern; Kontrolle: Werte von 2 Probanden aus der Pilotstudie EON-CIC-BV-1.

#### 4.5.10 Urinkonzentrationen der Prostanoid Thromboxan-B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) und 6-keto PGF<sub>1α</sub>

Die mittleren Konzentrationen von TxB<sub>2</sub> lagen während des Vormittags am höchsten und erreichten bei Referenz und Kontrolle in der Fraktion 0-4 h, im Test in der Fraktion 4-8 h ihr Maximum. Die niedrigsten Werte resultierten während der Nacht, in der Fraktion 12-24 h. Nach 24 h erschienen die Werte in der Fraktion 24-28 h gegenüber der Fraktion 0-4 h tendenziell erniedrigt. In der Fraktion 4-8 h lag im Test eine signifikant höhere Konzentration als in der Referenz vor.

Die Werte nach Applikation von 200 mg Ciclosporin zeigten zu keinem Zeitpunkt signifikante Abweichungen von den Kontrollen.

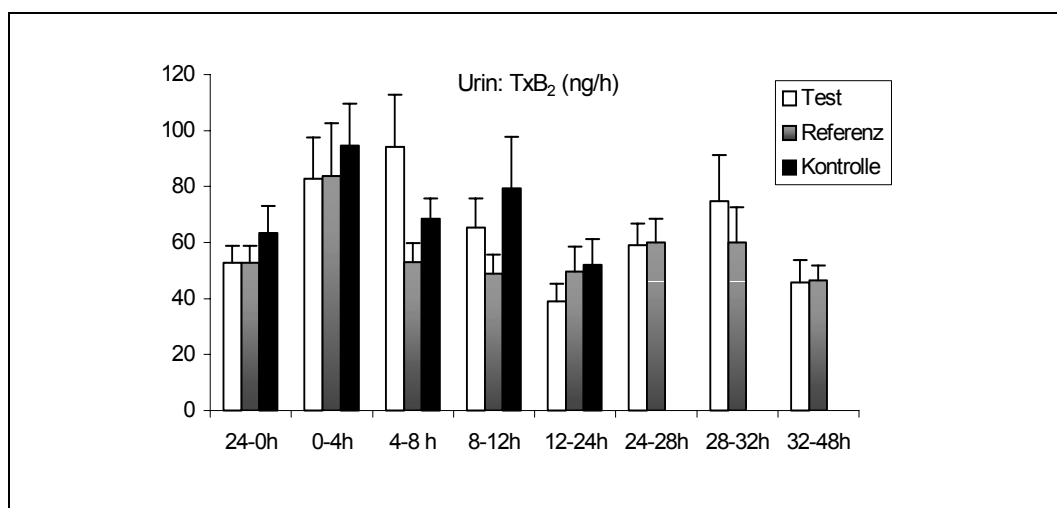


Abbildung 39: Urinkonzentrationen von TxB<sub>2</sub> nach Applikation von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup>, entsprechend 200 mg CsA, bei zwölf Probanden. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern (MW ± SEM).

Die Urinkonzentrationen von 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$  wiesen im Referenzschema und in der Kontrolle das Maximum in der Fraktion 0-4 h auf. Bei Einnahme von Ciclosporin nach fettreichem Frühstück (Test) wurde dieses erst in der Fraktion 4-8 h erreicht. Die Spiegel nach Ciclosporin-Applikation erschienen gegenüber der Kontrolle tendenziell niedriger. Der Vergleich von Test und Referenz wie auch von Tag 1 und 2 zeigte keine signifikanten Unterschiede.

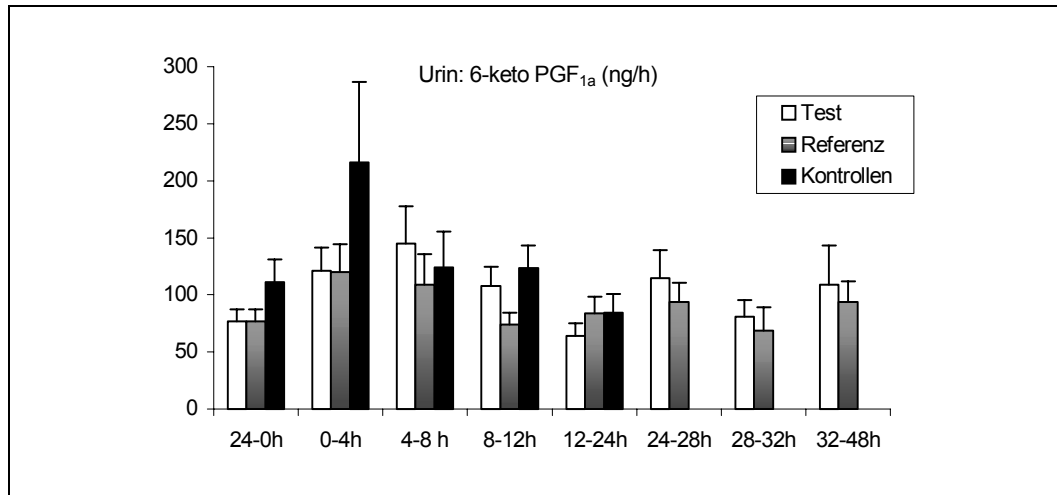


Abbildung 40: Urinkonzentrationen von 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$  nach Applikation von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup>, entsprechend 200 mg CsA, bei zwölf Probanden. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern ( $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ).

#### 4.5.11 Urinkonzentrationen von Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ )

Die totale Nitrit/Nitrat-Konzentration erschien gegenüber der Kontrolle von 0 – 12 h leicht erniedrigt. Die Unterschiede waren dabei weder zu den Kontrollen noch zwischen den beiden Behandlungsschemen signifikant.

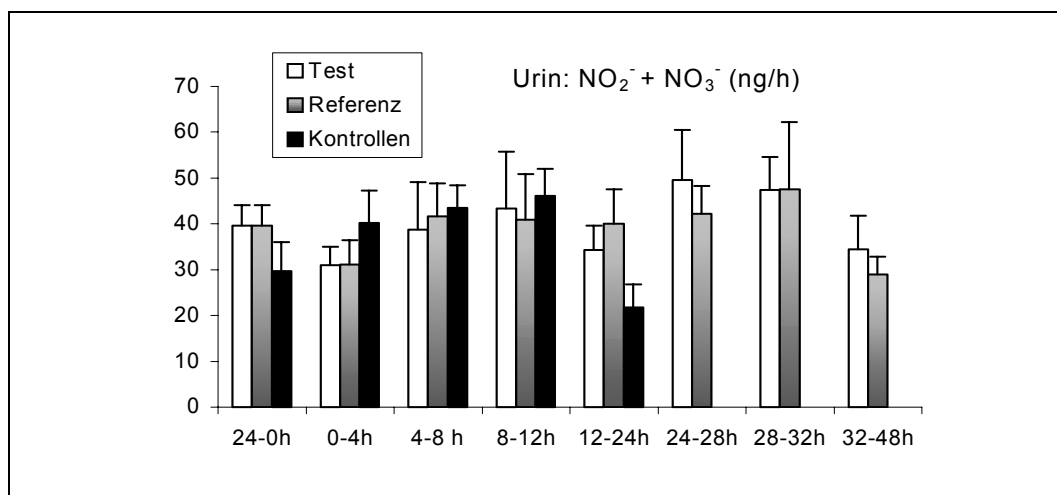


Abbildung 41: Totale Urinkonzentrationen von Nitrit und Nitrat nach Applikation von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup>, entsprechend 200 mg CsA, bei zwölf Probanden. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern ( $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ).

#### 4.5.12 Kreatininkonzentrationen in Plasma und Urin

Bei den Plasmaspiegeln von Kreatinin konnte nach Einnahme von 200 mg Ciclosporin gegenüber der Voruntersuchung ein Trend zu höheren Werten festgestellt werden. Die Urinkonzentrationen wie auch die Kreatinin-Clearance waren im Vergleich zur Voruntersuchung geringer. Die Clearance im Test- und Referenzschema war jeweils am Tag 2 signifikant niedriger als zur Voruntersuchung. Im Vergleich von Test vs. Referenz wie auch Tag 1 vs. Tag 2 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Kreatininkonzentrationen im Plasma lagen bei zwei Probanden (Nr. 1: 1,33 mg/dl und Nr. 6: 1,36 mg/dl) minimal über der Norm. Im Urin wurden bei der Voruntersuchung bei zwei Probanden (Nr. 2: 2688 mg/24h und Nr. 5: 2543 mg/24h) leicht erhöhte Werte, bei Proband 10 am Tag 2 des Testschemas (978 mg/24h) ein zu niedriger Wert festgestellt. Bei diesen Probanden zeigten sich zu den jeweiligen Zeitpunkten auch Normabweichungen in der Clearance: Nr. 2: 210, Nr. 5: 196 und Nr. 10: 64 ml/min.

*Tabelle 18: Kreatinin-Clearance und Kreatininkonzentrationen in Plasma und Urin von zwölf Probanden nach Applikation von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup>, entsprechend 200 mg CsA. Test: Einnahme nach fettreichem Frühstück; Referenz: Einnahme nüchtern ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).*

	Plasma-Krea. (mg/dl)	Urin-Krea. (mg/24h)	Clearance (ml/min)
Voruntersuchung	0,98 $\pm$ 0,04	2026 $\pm$ 97	146 $\pm$ 9
Test Tag 1	1,04 $\pm$ 0,03	1959 $\pm$ 41	131 $\pm$ 4
Tag 2	--	1859 $\pm$ 69	124 $\pm$ 5
Referenz Tag 1	1,06 $\pm$ 0,02	1961 $\pm$ 58	129 $\pm$ 4
Tag 2	--	1736 $\pm$ 99	114 $\pm$ 6
Nachuntersuchung	0,93 $\pm$ 0,03	--	--

#### 4.5.13 Verträglichkeit

##### Unerwünschte Ereignisse

Von neun der zwölf Probanden wurden insgesamt 14 unerwünschte Ereignisse registriert, die gleichmäßig auf die beiden Behandlungsperioden wie auch auf beide Behandlungsschemen (Einnahme nach fettreichem Frühstück und Nüchternapplikation) verteilt waren. Mehr als die Hälfte (neun Nennungen) der beobachteten unerwünschten Ereignisse lassen sich als zentralnervöse Ereignisse zusammenfassen. Ein möglicher Zusammenhang mit der Studienmedikation wurde als ‚wahrscheinlich‘ angegeben. Müdigkeit und Kopfschmerzen wurden vom Prüfarzt als ‚nicht verdächtig‘ beurteilt. Der Schweregrad der unerwünschten Ereignisse wurde mit leicht bis mäßig bewertet.

*Tabelle 19: Art und Anzahl der unerwünschten Ereignisse*

	Test	Referenz	Periode 1	Periode 2
Hyperthermie	4	3	4	3
Parästhesie (Finger)	1	1	2	0
Magendruck	1	1	2	0
Übelkeit	0	1	0	1
Müdigkeit	1	0	0	1
Kopfschmerzen	1	0	0	1

#### **4.5.14 Begleitmedikation**

An den Kinetiktagen nahm kein Proband zusätzliche Medikamente ein.

Zwischen den Perioden 1 und 2 nahm ein Proband (Nr. 6) einmalig Grippostad® wegen eines grippalen Infekts, ein anderer (Nr. 9) für eine Woche Staphylex® aufgrund eines Karbunkels an der Unterlippe.

#### **4.5.15 Interkurrente Erkrankungen**

Ein Proband (Nr. 9) litt nach Periode 1 an einem Karbunkel an der Unterlippe. Wegen der antibiotischen Behandlung (Staphylex®) konnte der Proband die Periode 2 erst mit einem Abstand von 27, statt wie vorgesehen sieben Tagen, absolvieren. Ein weiterer Proband (Nr. 6) berichtete von einem Schnupfen, der am Kinetiktag der Periode 2 noch nicht vollständig abgeklungen war.

#### **4.5.16 Abschlussuntersuchung**

Nach Abschluss der Periode 2 wurden die Probanden nochmals klinisch-chemisch untersucht. Wie bei der Voruntersuchung ergaben sich vereinzelt Werte außerhalb des Referenzbereichs, die nach Einschätzung des Prüfarztes jedoch nicht von klinischer Bedeutung waren.

### **4.6 Pilotstudie: Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cyclosporine Capsules (EonLabs) vs. Cicloral® (Hexal) an gesunden Probanden**

Studiencode: EON-CIC-BV-1

#### **4.6.1 Probandenpopulation**

An der Studie nahmen zwei männliche Probanden teil.

Proband 1: 27 Jahre, 68 kg Körpergewicht, 175 cm Körpergröße

Proband 2: 54 Jahre, 70 kg Körpergewicht, 174 cm Körpergröße

Beide Probanden waren Nichtraucher und Mitarbeiter des Lehrstuhls für Pharmakologie der Universität Regensburg.

#### **4.6.2 Vormedikation und Begleitmedikation**

Proband 2 gab als Dauermedikation Candesartan 4 mg/d an. An den Kinetiktagen wurde diese Medikation ausgesetzt. An den Kinetiktagen nahm kein Proband zusätzliche Medikamente ein.

#### 4.6.3 Randomisierung und Behandlung

Das Behandlungsschema wurde nach einem Randomplan verteilt. Beide Probanden erhielten am ersten Kinetiktag Cicloral<sup>®</sup> und am zweiten Cyclosporine Capsules. Der dritte Teil (ohne Cyclosporin-Medikation) war nicht randomisiert und wurde nach Abschluss der ersten beiden Studienabschnitte durchgeführt. Der zeitliche Abstand zwischen den ersten beiden Kinetiktagen betrug fünf Tage.

Die Handhabung des Blutabnahmezeitplans erfolgte entsprechend der Studie CIC-BV-1 (siehe Punkt 4.5.6). In keinem Fall lag der Entnahmezeitpunkt außerhalb des tolerierten Zeitfensters.

#### 4.6.4 Bioverfügbarkeit von Cyclosporin aus Cyclosporine Capsules (EON) und Cicloral<sup>®</sup> Kapseln (CIC)

Die mittleren Konzentrationen von Cyclosporin im Blut waren nach Applikation von zwei Cyclosporine Capsules (EON) mit je 100 mg Cyclosporin in der Resorptionsphase und im Bereich der Maximalkonzentration niedriger als nach Einnahme von zwei Kapseln Cicloral<sup>®</sup> (CIC) mit gleichem Wirkstoffgehalt. In der Eliminationsphase lagen die Werte bei EON zu jedem Zeitpunkt höher als bei CIC.

Die Blutkonzentrations-Zeit-Kurven sind nur bis 24 Stunden nach Applikation dargestellt, da die Cyclosporin-Konzentrationen zu den späteren Messzeitpunkten unter der Bestimmungsgrenze von 15 ng/ml lagen.

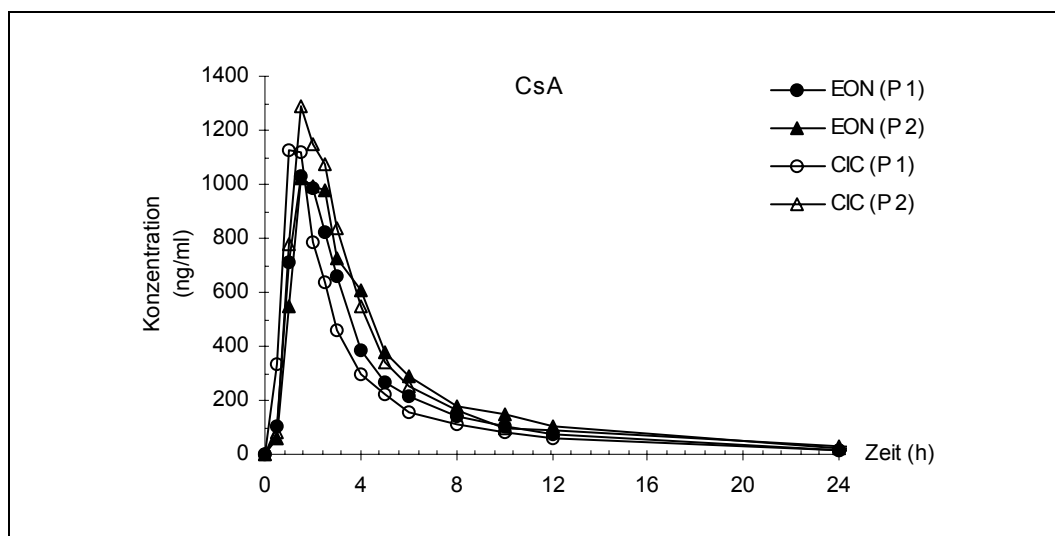


Abbildung 42: Konzentrations-Zeit-Verlauf von Cyclosporin im Vollblut von zwei Probanden (P 1, P 2) nach oraler Applikation von je zwei Kapseln Cyclosporine Capsules (EON) und Cicloral<sup>®</sup> (CIC). Wirkstoffgehalt je Kapsel: 100 mg Cyclosporin

Die Bioverfügbarkeit von Cyclosporin war bei EON höher als bei CIC. Die mittleren Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) betrugen ca. 1000 (EON) vs. 1200 ng/ml (CIC) und lagen somit bei EON um ca. 15 % niedriger.

Die Fläche unter der Kurve ( $AUC_{0-\infty}$ ) ergab bei EON etwa 5040 gegenüber 4870 ng/ml\*h bei CIC. Die Restfläche vom letzten Messzeitpunkt nach Unendlich ( $AUC_{\text{tlast}-\infty}$ ) lag mit weniger als 4 % deutlich unter der geforderten Grenze von 20 % (Blume und Mutschler, 1989). Somit war das Messintervall für die Blutentnahmen ausreichend lange gewählt.

Die Zeit bis zum Erreichen von  $C_{\max}$  ( $t_{\max}$ ) war bei EON mit 1,5 vs. 1,25 h etwas länger. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  wurde mit 5,7 h für EON und 6,3 h für CIC ermittelt.



Tabelle 20: Pharmakokinetische Parameter von Ciclosporin nach oraler Applikation von je zwei Kapseln EON und CIC mit je 100 mg Wirkstoff (MW  $\pm$  SD).

	EON		CIC	
	Prob. 1	Prob. 2	Prob. 1	Prob. 2
$C_{\max}$ (ng/ml)	1027	1025	1123	1289
$t_{\max}$ (h)	1,5	1,5	1,0	1,5
$t_{1/2}$ (h)	5,7	5,7	5,9	6,7
$AUC_{0-t_{\text{last}}}$ (ng/ml*h)	4400	5274	3966	5386
$AUC_{0-\infty}$ (ng/ml*h)	4589	5482	4091	5656
$AUC_{t_{\text{last}}-\infty}$ (% $AUC_{\infty}$ )	3,3	3,8	3,1	4,8

#### 4.6.5 Metabolisierung von Ciclosporin

In Abbildung 43 ist der Konzentrations-Zeitverlauf von AM1 und AM9 im Vollblut dargestellt. Die Kurven nach Einnahme von EON und CIC verlaufen bei beiden Metaboliten annähernd deckungsgleich. Bei AM1 war zwischen den Zeitpunkten 3 h und 4 h die Ausbildung eines Plateaus festzustellen. In der Eliminationsphase zeigte sich ein sehr flacher Kurvenverlauf.

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe sind nur bis 32 Stunden dargestellt, da eine Probennahme nach 48 h im Protokoll nicht vorgesehen war.

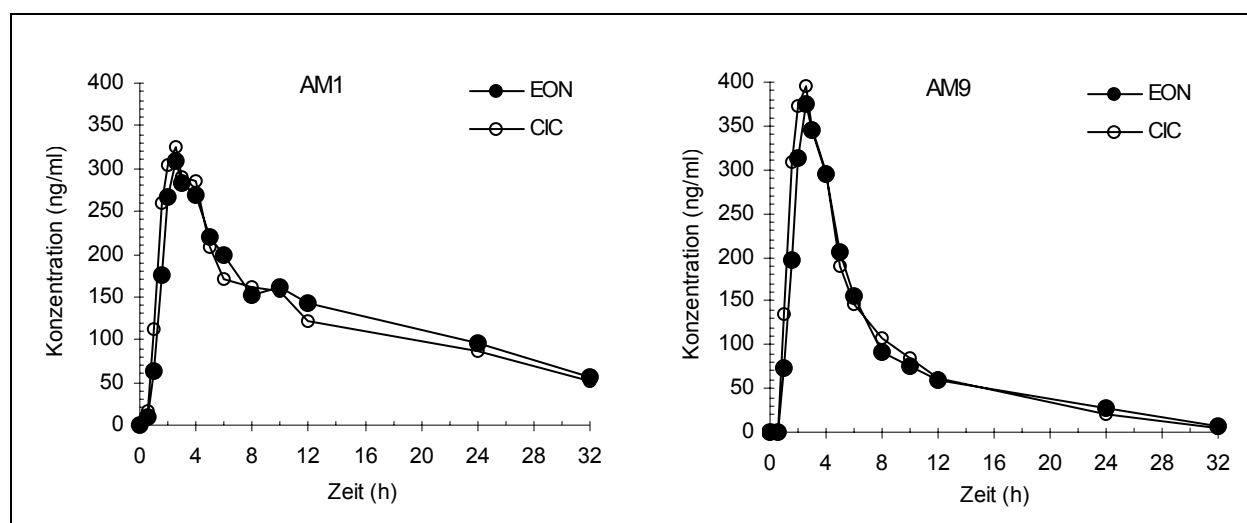


Abbildung 43: Mittelwert des Konzentrations-Zeit-Verlaufs der Metaboliten AM1 und AM9 im Vollblut nach oraler Applikation von je zwei Kapseln EON und CIC mit je 100 mg CsA.

Die Maximalkonzentrationen ( $C_{\max}$ ) beider Metaboliten lagen nach Einnahme von zwei Kapseln CIC knapp 10 % höher als bei EON. Der Zeitpunkt der Maximalkonzentration  $t_{\max}$  wurde sowohl bei AM1 (2,75 vs. 3,25 h) als auch bei AM9 (2,25 vs. 2,50 h) nach Applikation von CIC früher erreicht. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von AM1 war ungefähr doppelt so hoch als von AM9. Die AUC von AM1 war bei EON ca. 5 % größer als bei CIC, die AUC von AM9 zeigte mit ca. 2450 ng/ml\*h nach beiden Medikationen ein einheitliches Bild. Die Restfläche bei AM1 lag bei knapp unter 50 % und damit deutlich über der geforderten Grenze von 20 %.

Tabelle 21: Pharmakokinetische Parameter von AM1 und AM9 nach Einnahme von je zwei Kapseln EON und CIC mit je 100 mg CsA (MW  $\pm$  SD).

	AM1		AM9	
	EON	CIC	EON	CIC
$C_{\max}$ (ng/ml)	310 $\pm$ 11	339 $\pm$ 24	375 $\pm$ 130	401 $\pm$ 76
$t_{\max}$ (h)	3,25 $\pm$ 1,06	2,75 $\pm$ 1,77	2,50 $\pm$ 0,0	2,25 $\pm$ 0,35
$t_{1/2}$ (h)	20,8 $\pm$ 5,9	20,9 $\pm$ 7,2	10,2 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 3,0
$AUC_{0-t_{\text{last}}}$ (ng/ml*h)	1778 $\pm$ 241	1829 $\pm$ 461	2143 $\pm$ 50	2328 $\pm$ 392
$AUC_{0-\infty}$ (ng/ml*h)	3477 $\pm$ 138	3311 $\pm$ 209	2453 $\pm$ 112	2472 $\pm$ 412
$AUC_{t_{\text{last}}-\infty}$ (% $AUC_{\infty}$ )	48,7 $\pm$ 9,0	45,1 $\pm$ 10,5	12,5 $\pm$ 6,0	5,8 $\pm$ 0,2

#### 4.6.6 Plasmaspiegel von Cortisol und Cortison

Der Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf von Cortisol (CSL) zeigte bei EON und in der Kontrolle ein absolutes Maximum um ca. 8:00 Uhr (t-0 h bzw. -24 h). Dieses wurde bei CIC etwa 30 min später erreicht und die Spiegel blieben für weitere zwei Stunden gegenüber EON und Kontrolle erhöht. Die absoluten Minima lagen einheitlich nach 12 h um 20:00 Uhr vor. Ein Maximum im Tagesverlauf war in allen Behandlungsschemata bei t-5 h zu verzeichnen. Am Nachmittag ab ca. 16:00 Uhr waren die Cortisolspiegel nach Einnahme von CIC erhöht. Nach 24 h wurden die Ausgangswerte wieder erreicht.

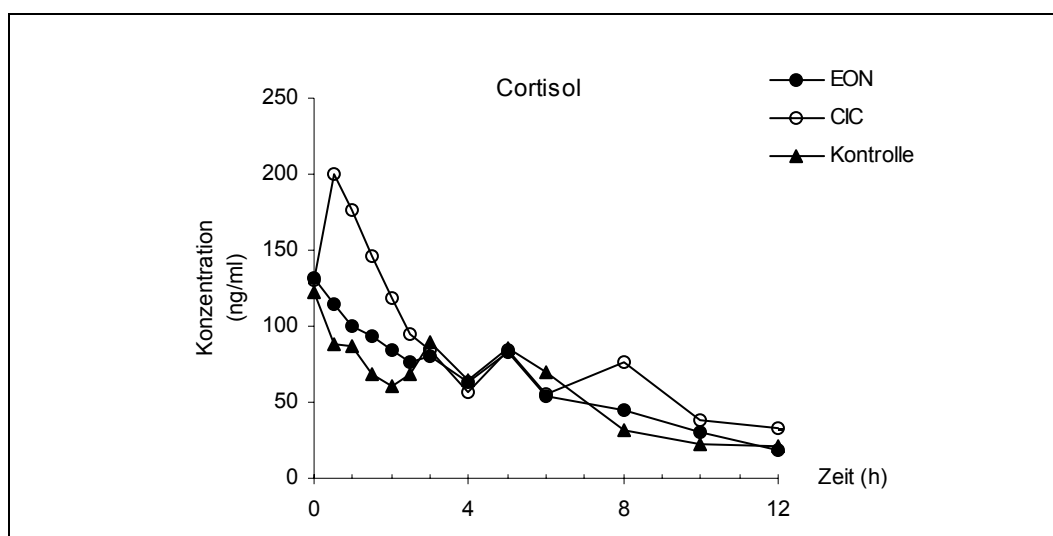


Abbildung 44: Cortisolspiegel (ng/ml) im Plasma nach Einnahme von je zwei Kapseln EON und CIC mit je 100 mg CsA.

Die Plasmakonzentrationen des Cortisons waren, entsprechend dem Cortisol, in der Kontrolle am Vormittag und Nachmittag niedriger als nach Ciclosporin-Medikation. Mittags zeigten sich die Spiegel einheitlich. Die absoluten Maxima lagen zu folgenden Zeitpunkten vor: EON 0 h, CIC 1,5 h und Kontrolle 1 h. Das absolute Minimum wurde gegen 20:00 Uhr erreicht.

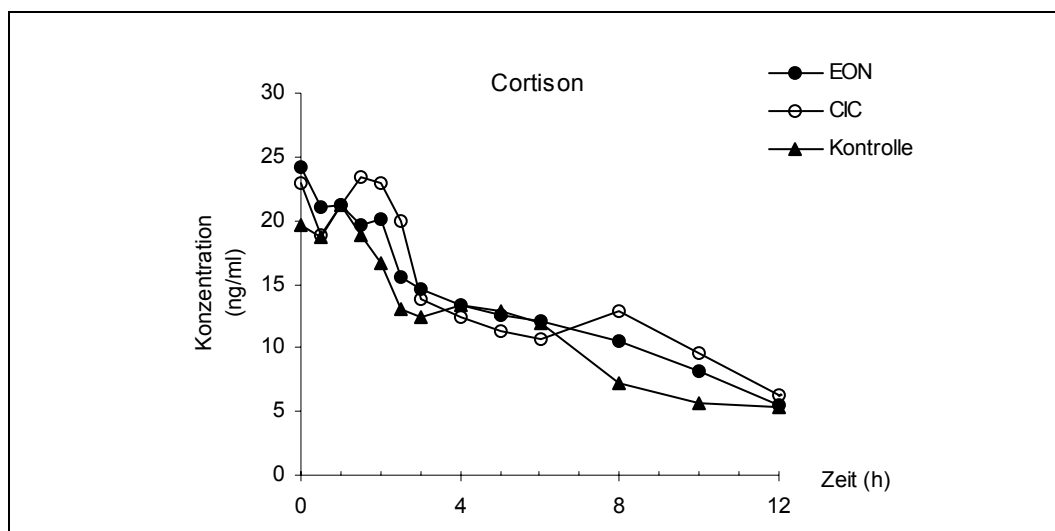


Abbildung 45: Cortisonspiegel (ng/ml) im Plasma nach Einnahme von je zwei Kapseln EON und CIC mit je 100 mg CsA

#### 4.6.7 Einfluss von Ciclosporin auf Blutdruck und Herzfrequenz

Die Veränderungen von Blutdruck und Herzfrequenz zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 8 h nach Einnahme von 200 mg Ciclosporin bzw. ohne Medikation sind in Abbildung 46 dargestellt. Der mittlere systolische Druck lag in allen drei Schemata bei ca. 140 mmHg, der diastolische bei 88 mmHg. Die Herzfrequenz betrug einheitlich 59 Schläge/min.

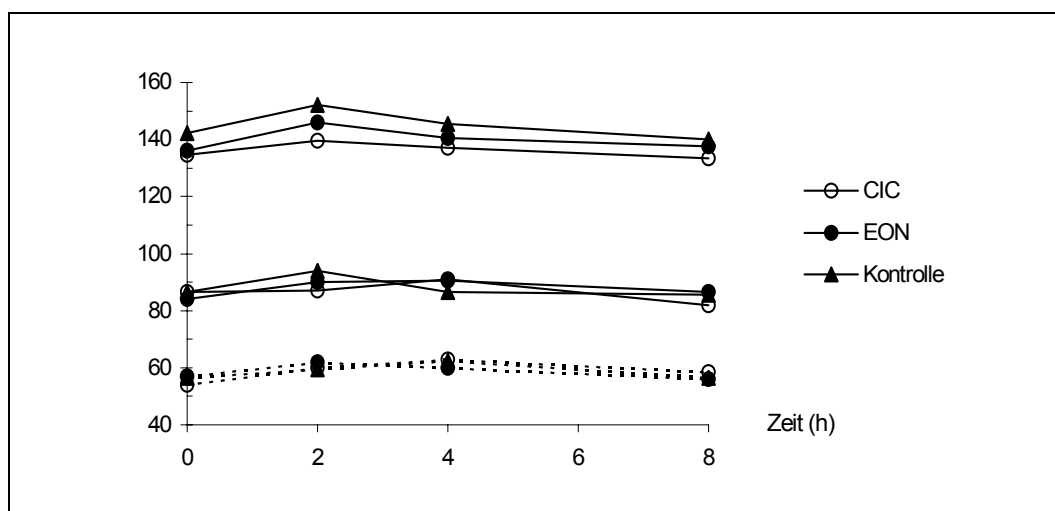


Abbildung 46: Blutdruck (mmHg) und Herzfrequenz (Schläge/min) nach Einnahme von je zwei Kapseln EON und CIC mit je 100 mg CsA bzw. ohne Medikation (Kontrolle). (Blutdruck: —, Herzfrequenz: - -)

#### 4.6.8 Verträglichkeit

Am Tag 1 klagten die Probanden direkt im Anschluss an das Legen der Verweilkanüle über Schwindel und Kreislaufschwäche, bei Proband 1 mit Kollapsneigung. Nach Einnahme der Studienmedikation trat an beiden Kinetiktagen ein leichtes Wärmegefühl in den Füßen auf.

## 5. Diskussion

### 5.1 In vitro Untersuchung zur Resorption von Ciclosporin am isolierten Rattenileum

Die Resorption von Ciclosporin aus dem Gastrointestinaltrakt unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren. Neben der Passagezeit im Darm (La Rosa et al. 1989) und der Sekretion von Gallensaft (Venkataramanan et al. 1986, Tredger et al. 1988) ist auch die Länge des Dünndarms (Whittington et al. 1990) von Bedeutung. Allerdings konnte bei Verdoppelung der zur Verfügung stehenden Darmlänge in der Ratte keine signifikante Verbesserung der Resorption erzielt werden (Tarr und Yalkowski 1989). Die gastrointestinale Aufnahme ist aber auch von der jeweiligen Formulierung des Arzneimittels abhängig (Kahan 1999 a).

In diesem in vitro Versuch sollte die Aufnahme von Ciclosporin aus einer Donorlösung durch isoliertes Ileum in eine Akzeptorlösung untersucht werden. Der Vergleich der generischen Formulierungen Gengraf™ (GEN) und Cyclosporine Capsules EonLabs (EON) mit dem Originalprodukt Sandimmun® Optoral (OPT) erfolgte an Darmstücken mit einer einheitlichen Länge von 7 cm, um eine Beeinflussung der Resorption durch variierende Absorptionsflächen zu vermeiden. Zur Lokalisation der Ciclosporin-Absorption innerhalb des Dünndarms gibt es zum Teil widersprüchliche Aussagen. Ericzon und Kollegen konnten an Hunden zeigen, dass Ciclosporin wie Fett resorbiert wird (Ericzon et al. 1987). Die Aufnahme von Fett ist im Ileum höher als im Jejunum (Kiyozaki et al. 1996), woraus man auf eine bevorzugte Resorption von Ciclosporin aus dem Ileum schließen könnte. Bei Einsatz der so genannten Tube-Insertion-Methode, bei welcher der Wirkstoff direkt in den zu untersuchenden Darmabschnitt injiziert wird, erfolgte die Resorption von Ciclosporin vorwiegend aus dem proximalen Dünndarm und weniger aus distalen Abschnitten (Sawchuk und Awni 1986, Cakaloglu et al. 1993). Bei oraler Gabe von Ciclosporin an Ratten mit teilentferntem oder transplantiertem Dünndarm erwies sich das Ileum dem Jejunum als überlegen (Ogino et al. 1999 a, b). In der vorliegenden Arbeit wurde das Ileum verwendet.

In der Donorlösung verhielten sich GEN und OPT sehr ähnlich, während bei EON ein rasch einsetzender, deutlicher Konzentrationsabfall zu verzeichnen war. Entsprechend lagen die Konzentrationen von EON im Ileum zu Beginn signifikant höher als bei OPT, nicht jedoch als bei GEN. In der Akzeptorlösung waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen, vielmehr scheint bereits nach einer Stunde eine Sättigung eingetreten zu sein. Dies ist vermutlich auf den stationären Charakter des Akzeptors zurückzuführen. Als Erklärung für den abweichenden Konzentrations-Zeit-Verlauf von EON im Donor reicht die höhere Adhäsion an das Ileum allein nicht aus. EON ist zwar in höheren Konzentrationen als OPT an das Ileum gebunden aber in vergleichbaren Mengen mit GEN. Dieses zeigt im Donor aber ein von EON verschiedenes Verhalten. Eine mögliche Ursache könnte eine verstärkte Adsorption von EON an die Glaswand des Organbads sein.

Als Gründe für die verstärkte Adhäsion von EON an das Ileum kommen Unterschiede in den Tröpfchengrößen und den Ladungsverhältnissen in Frage. Die Oberflächenladung und die Teilchengröße beeinflussen in vitro die Interaktion von Wirkstoffen mit der Mukosa des, analog diesem Versuch, präparierten Dünndarms (Gershanik et al. 1998). Darmzellen besitzen eine negative Ladung (Corbo et al. 1990, Rojanasakul et al. 1992) und haben eine größere elektrostatische Wechselwirkung mit positiv geladenen Tröpfchen. Im Zusammenhang mit Mucin weisen Mikroemulsionen wie OPT andere Ladungsverhältnisse auf als feine oder grobe Emulsionen (Gershanik et al. 1998). Dass es sich bei EON nicht um eine Mikroemulsion handelt, ließ sich nach Verdünnen des Kapselinhalts mit Wasser demonstrieren (siehe Abbildung 22). Größere Tröpfchen haben eine höhere Affinität zur Schleimhaut des Jejunums und Ileums

(Gershanik und Benita 2000). Für OPT sind Partikelgrößen der Mikroemulsion in Magensaft von unter 150 nm (Ritschel 1996) bzw. 100 nm (Vonderscher und Meinzer 1994), für EON von ca. 240 nm (Thomas 2002) beschrieben. Diese Unterschiede in der Ladung und den Tröpfchengrößen scheinen für die gesteigerte Affinität von EON an die Oberflächen der Darmmukosa, eventuell aber auch für den raschen Konzentrationsverlust in der Donorlösung verantwortlich zu sein.

## 5.2 Adsorption von Ciclosporin an Glasoberflächen

Ausgehend von den Erkenntnissen aus dem Versuch am isolierten Rattenileum sollte das Adsorptionsverhalten von Ciclosporin aus den generischen Formulierungen Cyclosporine Capsules EonLabs (EON) und Cicloral<sup>®</sup> (CIC), sowie den Produkten des Originalherstellers Sandimmun<sup>®</sup> (SIM) und Sandimmun<sup>®</sup> Optoral (OPT) untersucht werden. Nach dem Verdünnen des Kapselinhalts mit Wasser waren auffallende Unterschiede in der Galenik der verschiedenen Formulierungen zu beobachten. OPT, ein self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS), war transparent, während sich bei SIM eine o/w Emulsion einstellte. Dies entspricht veröffentlichten Berichten bzw. Photographien (Meinzer et al. 1997). Die beiden Generika waren dezent trüb, es bildete sich aber ein milchiger Bodensatz, der sich leicht aufschütteln ließ. Weder bei EON noch bei CIC resultierte nach Kontakt mit Wasser eine Mikroemulsion wie dies für OPT beschrieben ist (Vonderscher und Meinzer 1994).

Das Adsorptionsverhalten offenbarte ebenfalls markante Unterschiede zwischen den Formulierungen. Bei OPT waren keine Verluste festzustellen, bei SIM sank die Wiederfindung von Ciclosporin nach 6 Stunden auf unter 40 %. Der Zeitverlauf der Wiederfindungen bei den Generika lag zwischen OPT und SIM und war bei EON nach 4 Stunden, bei CIC nach 6 Stunden gegenüber OPT signifikant erniedrigt. In der Literatur finden sich keine Angaben zum Adsorptionsverhalten von Ciclosporin aus gelösten Kapseln. Die Wahrscheinlichkeit der Adsorption eines Wirkstoffes aus einer thermodynamisch stabilen Mikroemulsion heraus ist jedoch sicher geringer als aus einer instabilen Emulsion. Eine Beeinflussung durch Licht ist unwahrscheinlich (Ptachcinski et al. 1986). Vielmehr scheint die unterschiedliche Qualität in der Galenik direkt für die zum Teil deutlichen Verluste verantwortlich zu sein.

Für Patienten die nicht in der Lage sind, z.B. direkt postoperativ Kapseln zu schlucken, stehen Trinklösungen von Optoral<sup>®</sup> und Cicloral<sup>®</sup> zur Verfügung. Die Formulierungen sind bioäquivalent (Hexal AG 2000). Die Untersuchung der Adsorption an Glas von Ciclosporin aus diesen beiden Lösungen in handelsüblichen Trinkgläsern zeigte keine Unterschiede. Nach 2 Stunden war die Ausgangskonzentration jeweils wiederzufinden. Dies entspricht Berichten, dass Ciclosporin-Lösungen in Glasbehältern stabil zu lagern sind, während aus Kunststoffgefäßen Weichmacheranteile herausgelöst werden können und Verluste bei Ciclosporin auftreten (Ptachcinski et al. 1986, Parr et al. 1988). Die verwendete Ausgangskonzentration entspricht in etwa einer Dosis von 3 mg/kg/d bei einer 65 kg schweren Person, wie sie in der Erhaltungstherapie durchaus üblich ist. Es ist demnach auch bei Stehenlassen der trinkfertigen Lösungen bis zu 2 Stunden nicht mit einer Beeinträchtigung der Dosierungsgenauigkeit zu rechnen.

### 5.3 Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus, in Wasser bzw. Olivenöl gelösten Cyclosporine Capsules (EonLabs) und Sandimmun® Optoral Kapseln (Novartis) bei Ratten unter steady-state Bedingungen

OPT und EON haben in vitro ein signifikant unterschiedliches Verteilungsverhalten zwischen verschiedenen pflanzlichen Ölen bzw. fettreichem Nahrungsbrei und künstlichem Magensaft (Thomas 2002). In einem Versuch an Ratten unter steady-state Bedingungen konnten Koehler und Kollegen eine völlig abweichende Kinetik zwischen OPT und EON demonstrieren. OPT erreichte im Vollblut die etwa doppelte Maximalkonzentration und eine ca. 15 % höhere AUC als EON (Koehler et al. 2002). Aufgrund dieser Daten und Ergebnissen aus den eigenen in vitro Untersuchungen sollte an Ratten der Einfluss fettreicher Nahrung auf die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin untersucht werden. Zur Simulation einer fettreichen Ernährung wurde als Wirkstoffvehikel Olivenöl anstelle von Wasser verwendet. In einem Vorversuch wurde der Zeitraum bis zum Erreichen von steady-state Bedingungen mit Optoral auf ca. 3 Tage bestimmt, wenngleich im Vollblut nach 7 Tagen ein nochmaliger leichter Anstieg der Konzentrationen zu verzeichnen war. Dies ist vermutlich der variablen Bioverfügbarkeit von Ciclosporin zuzuschreiben. Die Medikationsperiode wurde somit auf 6 Tage festgelegt. Die Talspiegel unter Optoral-Therapie (Kapseln gelöst in Wasser) im Versuch stimmten mit ca. 750 ng/ml mit dem Vorversuch überein. Das Körpergewicht der Ratten blieb in allen Gruppen im Verlauf der sechstägigen Ciclosporin-Gabe konstant. Dies deckt sich mit Beobachtungen, dass männliche Ratten bei Applikation von Olivenöl erst nach 8 bis 9 Tagen signifikant zunehmen (Yamasaki et al. 2001).

#### 5.3.1 Bioverfügbarkeit von Ciclosporin

Beim Vergleich der Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus in Wasser gelösten Kapseln lag die AUC bei EON um über 25 % niedriger als bei OPT,  $C_{\max}$  erreichte lediglich ein Drittel des Referenzwertes. Die deutlichen Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von EON und OPT wie auch die Werte für  $C_{\max}$  stimmen mit veröffentlichten Daten überein (Koehler et al. 2002). Die für EON beschriebene deutliche Verzögerung bis zum Erreichen von  $C_{\max}$  konnte nicht bestätigt werden. Die Werte für  $t_{\max}$  lagen einheitlich bei ca. 2 Stunden. Bei in Öl gelösten Kapseln wurden sehr viel niedrigere Konzentrationen erreicht, wenngleich sich in den Talspiegeln ( $C_0$  bzw.  $C_{24}$ ) kaum Abweichungen zu den in Wasser gelösten Kapseln feststellen ließen. In den Gruppen EON-öl und OPT-öl war  $t_{\max}$  mit ca. 4 Stunden gegenüber den in Wasser gelösten Kapseln verdoppelt. Dieser Effekt von Nahrungsfett auf die Kinetik von Ciclosporin ist aus Probandenstudien mit Sandimmun® bekannt (Mueller et al. 1994 a).

Eine generelle Malabsorption aus dem Darm scheint als Ursache für die niedrige Bioverfügbarkeit von Ciclosporin bei EON-öl und OPT-öl ausgeschlossen, da alle Tiere eine vergleichbare Gewichtsentwicklung hatten. Diarrhoen wurden nicht beobachtet. Ein Grund für die reduzierte Bioverfügbarkeit könnte die leicht laxierende Wirkung von Olivenöl sein. Dies führt zu einer Verkürzung der Passagezeit im Gastrointestinaltrakt, die indirekt proportional zur Absorption von Ciclosporin ist (Cakaloglu et al. 1993). Im Tierversuch an Ratten (Sigalet et al. 1992) und Kaninchen (Dias et al. 1998) war die Resorption von Fett aus der Nahrung bei Mehrfachgabe von Ciclosporin bzw. einer Kombination mit Rapamycin reduziert. Da Ciclosporin aus Mischmizellen (bestehend aus Monoglyceriden, Gallensalzen und dem Wirkstoff selbst) resorbiert wird, könnte dies ein Grund für die reduzierte Bioverfügbarkeit sein. Des weiteren wirkt Ciclosporin bei akuter und chronischer Anwendung hemmend auf die Ausscheidung von Galle (Le Thai et al. 1988, Roman et al. 1990, Sauer et al. 1995). Dies vermindert die Emulgierung lipophiler Bestandteile und dadurch auch deren Resorption. Im

isolierten Rattenjejunum sank nach vorangegangener fettreicher Ernährung der Tiere die Aufnahme von lipophilen Wirkstoffen wie Diazepam und Digoxin signifikant (Vine et al. 2002). Eine verschlechterte Aufnahme des sehr lipophilen Ciclosporins wäre deshalb denkbar. Darüber hinaus beeinflussen Nahrungsfette die Enzyme der CYP-450-Familie, über welche auch Ciclosporin verstoffwechselt wird. Die in der Leber männlicher Ratten vorherrschenden Isoformen 3A2 und 2C11 (Waxman et al. 1995) werden durch Ciclosporin gehemmt (Brunner et al. 2000, Bai et al. 2001, Lu et al. 2003). Sojaöl führt bei Ratten zu einer Induktion von 3A2 während Olivenöl 2C11 inhibiert (Brunner und Bai 2000). Der Mechanismus über den Nahrungsfette in die Metabolisierung eingreifen ist noch unklar, vermutlich jedoch über eine Beeinflussung der Membranzusammensetzung und -stabilität (Sanchez und Lutz 1998). Inwieweit diese Aspekte für die reduzierte Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus in Öl gelösten Kapseln verantwortlich sind lässt sich nicht abschließend klären.

### 5.3.2 *Metabolisierung und Gewebsverteilung von Ciclosporin*

Nahrungsfette wie auch die Applikation von Ciclosporin können die Menge und Aktivität der CYP-3A Enzyme beeinflussen (Ammouche et al. 1993, Richard et al. 1998). Ein derartiger Effekt hätte sich nach sechstägiger Gabe von Ciclosporin in Kombination mit Olivenöl in der Metabolisierung des Immunsuppressivums niederschlagen müssen. Bei EON-öl waren für den Metaboliten AM1 in der Tat höhere Konzentrationen als bei EON-w festzustellen. Die Steigerung gegenüber EON-w betrug für  $C_{\max}$  66 % und für die AUC 17 %, obwohl die AUC der Muttersubstanz um knapp 50 % niedriger lag. In der Gruppe EON-öl war dabei die sehr hohe Variabilität in den AM1-Spiegeln auffallend, die auf eine stark unterschiedliche Enzymmenge bzw. -aktivität hindeutet. Ein gegenteiliges Bild offenbart sich bei AM9 mit höheren Werten für AUC und  $C_{\max}$  bei EON-w im Vergleich zu EON-öl. Bei OPT-w waren die Blutspiegel von AM1 und AM9 gegenüber OPT-öl ebenfalls erhöht, bei gleichzeitig größerer Bioverfügbarkeit von Ciclosporin. Die höheren Metabolitenkonzentrationen in den Wassergruppen scheinen direkt aus der dort höheren Bioverfügbarkeit von Ciclosporin zu resultieren. Die Variabilität von  $t_{\max}$  war in den beiden Öl-Gruppen durchweg höher. Dies erklärt zum Teil die mitunter auffallenden Konzentrations-Zeit-Verläufe der Metaboliten.

Neben einer ausgeprägten Metabolisierung unterliegt Ciclosporin auch einer extensiven Verteilung. Diese wird durch die Affinität des Wirkstoffs zu verschiedenen Geweben sowie deren Permeabilität bestimmt. Die hohe Lipophilie von Ciclosporin lässt auf eine Verteilung vorwiegend in Fettgewebe schließen. In einer Studie an normal- und übergewichtigen Probanden wurde allerdings ein vergleichbares Verteilungsvolumen gefunden (Blouin und Warren 1999). Bei Ratten zeigen Weibchen im Vergleich zu Männchen trotz ihres höheren Fettgehalts ein geringeres Verteilungsvolumen (Molpeceres et al. 1998). Diese Befunde unterstreichen die wichtige Rolle der Permeabilität, die von der Aktivität und Menge von P-glycoprotein beeinflusst wird. Weibliche Ratten weisen ein vielfach höheres Vorkommen von P-gp (Furuya et al. 1994, Salphati und Benet 1998) und eine höhere Clearance als Männchen auf (Takami et al. 1995, Brunner et al. 1996). Metabolisierung und Verteilung von Ciclosporin hängen bei Ratten vom Alter und Geschlecht der Tiere ab (Molpeceres et al. 2000). Die höchsten Gewebskonzentrationen an Ciclosporin finden sich bei Weibchen im Fettgewebe, bei Männchen in der Leber (Napoli et al. 1998, Molpeceres et al. 2000). Diese Verteilung wurde in allen Gruppen bestätigt, mit höchsten Konzentrationen in der Leber bei OPT-w. In der Niere fanden sich die höchsten Werte ebenfalls in der Gruppe OPT-w, im Ileum bei EON-w. Die dominierende Adhäsion von EON an das Ileum im Vergleich zu Optoral war bereits im in vitro Versuch (siehe oben) zu erkennen und wurde mit diesem in vivo Ergebnis untermauert. Die

Gewebespiegel waren, entsprechend der größeren Bioverfügbarkeit von Ciclosporin, in den Wasser-Gruppen höher als in den Öl-Gruppen.

OPT-w ergab gegenüber EON-w eine bessere Bioverfügbarkeit von Ciclosporin. Bei ähnlichen Gewebespiegeln waren die Konzentrationen von AM1 und AM9 im Vollblut höher. Dies lässt auf eine bessere Resorption von Ciclosporin aus Optoral im Vergleich zu EON schließen. Bei der Beurteilung der Resultate darf nicht außer Acht gelassen werden, dass das Auflösen der Kapseln in Wasser oder Öl eine massive Manipulation der Galenik darstellt und die Daten nicht ohne weiteres auf eine ‚normale‘ perorale Einnahme übertragbar sind.

#### **5.4 Pilotstudie: Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cyclosporine Capsules (EonLabs) vs. Cicloral® (Hexal) an gesunden Probanden**

Die Ergebnisse aus in vivo Versuchen zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Ciclosporin an Ratten deuten auf signifikante Unterschiede zwischen OPT und dem generischen EON hin (siehe Punkt 3.9, Koehler et al. 2002). EON offenbarte dagegen in verschiedenen in-vitro-Versuchen ein sehr ähnliches Bild wie CIC (siehe Punkt 3.7, Thomas 2002). Die Firma EonLabs ist laut Internetpräsentation der Hexal AG deren strategischer Partner in den USA. Das Produkt von EonLabs stellt das Generikum der Hexal AG auf dem US-Markt dar (Rass 2001). Beide Produkte unterscheiden sich jedoch zumindest im Ethanolgehalt in den Kapseln (EonLabs 1999, Hexal AG 2002). In einer Pilotstudie sollten durch Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus EON und CIC Hinweise gewonnen werden, in wie weit beide Produkte übereinstimmen. Die Studie hatte einen rein deskriptiven Charakter; die Daten von 2 Probanden sind für statistische Aussagen nicht ausreichend.

##### **5.4.1 Bioverfügbarkeit von Ciclosporin**

Nach Nüchternapplikation von 200 mg Ciclosporin aus Cicloral® Kapseln wurde mit ca. 1200 ng/ml eine um 15 % höhere Maximalkonzentration als mit EON erreicht. Die AUC differierte um etwa 3 %. Da in die Berechnung der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve die Blutspiegel zu allen Messzeitpunkten einfließen, stellt die AUC den robusteren kinetischen Parameter im Vergleich zu  $C_{\max}$  und  $t_{\max}$  dar. Diese werden unter anderem stark vom Intervall der Probenentnahmen beeinflusst. Beide Produkte zeigen somit ein fast identisches Ausmaß, mit welchem der Wirkstoff im systemischen Kreislauf verfügbar wird.

Die für CIC ermittelten Werte für  $C_{\max}$  (1206 ng/ml), AUC (4873 ng/ml\*h) und  $t_{\max}$  (1,25 h) stimmen mit Daten aus einer früheren Probandenstudie überein, für die bei gleicher Dosierung folgende Werte dokumentiert sind:  $C_{\max}$  1104 ng/ml, AUC 4884 ng/ml\*h und  $t_{\max}$  1,5 h (Hexal AG 1996).

Die Konzentrations-Zeit-Diagramme der beiden Hauptmetaboliten AM1 und AM9 zeigten bei EON und CIC einen annähernd deckungsgleichen Verlauf. Die Maximalkonzentrationen beider Metaboliten unterschieden sich um weniger als 10 %. Die AUC differierte bei AM1 um 5 %, bei AM9 um weniger als 1 %. Beide Produkte weisen ein vergleichbares Muster der Hauptmetaboliten AM1 und AM9 auf. Für die Untersuchung des Einflusses von fettreicher Nahrung auf die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin bei gesunden Probanden fiel aufgrund der Datenlage die Entscheidung auf Cicloral® als Prüfmedikation.



### **5.4.2 Einfluss von Ciclosporin auf Cortisol- und Cortisonspiegel**

Das Glucocorticoid Prednisolon galt vor Einführung von Ciclosporin als das wichtigste Immunsuppressivum und ist neben diesem nach wie vor Bestandteil der Standardtherapie nach Organtransplantationen (Hall et al. 1988). Bereits in den 1980er Jahren wurde nach einem geeigneten Instrument gesucht, um den therapeutischen Effekt von Prednisolon vorausbestimmen zu können. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Cortisolspiegeln von Nierentransplantierten und dem Risiko einer Transplantatabstoßung (Kozaki et al. 1989, Oka et al. 1990). In Tierversuchen wurde eine Erhöhung der Cortisolspiegel nach zweimaliger Ciclosporin-Gabe festgestellt (Cufer et al. 1995), die vermutlich die Folge einer Stimulierung von Corticotropin (ACTH) durch Ciclosporin ist (Sheppard 1995, Cufer et al. 1998). Insgesamt betrachtet wurde in der Literatur der Frage nach dem Einfluss von Ciclosporin auf die physiologischen Spiegel von Cortisol und Cortison allerdings wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

In der Pilotstudie sollte der Einfluss einer peroralen Einzeldosis von 200 mg Ciclosporin auf die Cortisol- und Cortisonspiegel bei gesunden Probanden untersucht werden. In Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen circadianen Rhythmus (Palm et al. 1996) lagen die maximalen Konzentrationen von Cortisol und Cortison morgens gegen 8:00 Uhr, die Minima am späten Abend vor. Auffallend sind die erhöhten Cortisolspiegel bis 3 Stunden nach Einnahme von CIC. Diese lassen sich als stressbedingte Reaktion des Körpers auf die Kreislaufschwäche beider Probanden nach dem Legen der Verweilkanüle erklären (Wood 1986, Vedhara et al. 2003). Die Nahrungsaufnahme 2 und 4 Stunden nach Einnahme der Medikation war mit einem postprandialen Anstieg der Cortisolkonzentrationen verbunden (Hansen et al. 1997, Svec und Shawar 1997). Zwischen den beiden Behandlungsschemen mit je 200 mg Ciclosporin und der Kontrolle konnte bezüglich der Cortisolspiegel und des circadianen Rhythmus kein Unterschied festgestellt werden. Entgegen publizierter Daten, die nach einmaliger Gabe von Ciclosporin einen signifikanten Anstieg des diastolischen bzw. systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz zeigen (Hansen et al. 1999, Gossmann et al. 2001) ergaben sich in dieser Pilotstudie keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle.

### **5.5 Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cicloral® bei gesunden Probanden – Einnahme nach fettreichem Frühstück vs. Nüchternapplikation**

Ciclosporin wird der Gruppe der so genannten ‚critical dose drugs‘ zugeordnet (Patnaik et al. 1997, Barr 1999 b, Sabatini et al. 1999). Diese Pharmaka zeichnen sich durch einen schmalen therapeutischen Bereich, die Notwendigkeit eines Blutspiegel-Monitorings und eine niedrige und variable Resorption aus. Sie besitzen zudem eine breite inter- und intraindividuelle pharmakokinetische Variabilität (Johnston et al. 1997, Kahan 1999 a), die im Falle von Ciclosporin entscheidenden Einfluss auf die Häufigkeit und Schwere von Nebenwirkungen aber auch Abstoßungsreaktionen hat. Die Pharmakokinetik von Ciclosporin bei Transplantationspatienten hängt neben zahlreichen Faktoren wie dem klinischen Status (Zeit nach Transplantation), dem transplantierten Organ, der Begleitmedikation (CYP-Induktoren und –Inhibitoren) und dem Alter der Patienten auch von der Nahrung ab (Christians et al. 2000). Studien an Patienten und gesunden Probanden zur Untersuchung des Einflusses von Nahrung auf die Resorption von Ciclosporin aus Sandimmun® offenbarten zum Teil keinen signifikanten Effekt (Lindholm et al. 1990, Honcharik 1991), aber auch eine Verbesserung der Resorption (Ptachcinski et al. 1985, Gupta et al. 1990). Diese widersprüchlichen Ergebnisse scheinen ihre Ursache im unterschiedlichen Fettgehalt der Nahrung zu haben (Gupta et al. 1990, Honcharik et

al. 1991). Müller und Kollegen stellten bei Einnahme von Sandimmun® nach einer fettreichen Mahlzeit eine signifikant erhöhte Bioverfügbarkeit bei fast verdoppelter  $t_{\max}$  fest (Mueller et al. 1994 a). In der gleichen Studie waren die Auswirkungen von Nahrung bei der Mikroemulsionsformulierung Sandimmun® Optoral weitaus geringer, mit konstantem  $t_{\max}$  und einer erniedrigten AUC. Diese pharmakokinetischen Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die, nach wie vor aktuelle Forderung und das Streben nach Mikroemulsionsformulierungen bei ciclosporinhaltigen Arzneimitteln.

### 5.5.1 Bioverfügbarkeit von Ciclosporin

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Nahrung auf die Bioverfügbarkeit von Cicloral® anhand eines fettreichen, hochkalorischen Frühstücks nach Vorgabe der FDA getestet (FDA 2001 a). Bei Einnahme von Cicloral® nach der Mahlzeit ergab sich sowohl eine signifikante Erhöhung von  $C_{\max}$  um 33 % als auch der AUC um 22 %. Gemessen an den Daten von Müller et al. würde diese deutliche Zunahme der Bioverfügbarkeit Parallelen zur alten Ciclosporin-Formulierung Sandimmun® und weniger zu Sandimmun® Optoral nahe legen. Überraschend ist die leicht verkürzte  $t_{\max}$  von Cicloral® im Testschema, da fettreiche Nahrung die Verweilzeit im Magen erhöht und somit zu einem verzögerten Anfluten führen sollte (Drewe et al. 1992). Als Ursache sowohl für die schnelle Invasion als auch die verbesserte Bioverfügbarkeit kommt eine stark gesteigerte Ausscheidung von pankreatischem Verdauungssaft und von Gallensaft durch fettreiches Essen in Betracht. Beides erzeugt eine optimierte Emulgierung des lipophilen Ciclosporins im Dünndarm (Mehta et al. 1988). Dies würde auf eine von Gallensaft abhängige Resorption von Cicloral® hinweisen, wogegen für die Absorption der Mikroemulsionsformulierung Sandimmun® Optoral keine Emulgierung durch Gallensalze nötig ist (Mueller et al. 1995, Levy 1999). Zudem erwies sich in einer Studie an 55 nierentransplantierten Patienten die Bioverfügbarkeit von Optoral als nahrungsunabhängig. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Nüchterneinnahme bzw. der Applikation nach einer fettarmen oder fettreichen Mahlzeit. Optoral war dabei der Referenz Sandimmun® in der intraindividuellen Variabilität deutlich überlegen (Kahan et al. 1995).

In der immunsuppressiven Dauertherapie ließe sich mit der Einnahme von Cicloral® nach einer fettreichen Mahlzeit eine signifikant verbesserte Bioverfügbarkeit erzielen, allerdings unter Inkaufnahme einer erheblich gesteigerten Variabilität (siehe Abbildung 31). In der Therapie mit Ciclosporin ist eine hohe Variabilität jedoch kritisch zu bewerten, da sie sowohl mit akuten als auch chronischen Abstoßungen des transplantierten Organs assoziiert ist (Inoue et al. 1994, Kahan et al. 1996, Oellerich et al. 1998). Die Reduktion intraindividuelle Schwankungen in der Bioverfügbarkeit hat eine geringere Anzahl von Transplantatverlusten zur Folge und trägt somit zur Absenkung der Behandlungskosten bei (Kahan et al. 2000 a). Darüber hinaus wäre bei einem Standard-Dosierungsintervall von 12 Stunden der zweimal tägliche Verzehr einer derart fettreichen und hochkalorischen Mahlzeit schon unter kardiovaskulären Gesichtspunkten nicht empfehlenswert. Folglich wäre bei der Umstellung eines Patienten von Optoral auf Cicloral® dessen Ernährung auf einen mittleren Fettgehalt zu standardisieren. Eine derartige Lösung ist für die alltägliche Anwendung jedoch sicher nicht umsetzbar.

Für Cicloral® konnte zwischen den beiden Applikationsarten nüchtern vs. nach einem fettreichen Frühstück Bioäquivalenz nicht nachgewiesen werden. Die 90%-Konfidenzintervalle für  $C_{\max}$  (1,15 – 1,43) und die AUC (1,12 – 1,30) überschritten die von EMEA und FDA geforderten Bioäquivalenzgrenzen von 0,80 – 1,25 (EMA 2001, FDA 2002). Der Einnahmezeitpunkt der Medikation in Bezug zur Nahrungsaufnahme spielt demzufolge eine bedeutende Rolle. Die Applikation von Cicloral® ohne Beachtung der Nahrungsaufnahme birgt die Gefahr einer Unter- bzw. Überdosierung und ist mit einer gesteigerten intraindividuellen kinetischen Variabilität

verbunden. Da die Zunahme der Variabilität mit einer Steigerung der Transplantatverlustrate und damit der Behandlungskosten verbunden ist, wäre das primäre Argument pro Generika der Kosteneinsparung ad absurdum geführt. Patienten sollten in jedem Fall dazu angehalten werden, die Medikation einheitlich vor oder nach den Mahlzeiten einzunehmen.

Aus der Probandenpopulation dieser Studie ist Proband 1 hervorzuheben. Entgegen der mittleren Bioverfügbarkeit ergab sich hier bei Einnahme der Medikation nach dem Essen eine reduzierte Bioverfügbarkeit von Ciclosporin. Während bei der Nüchternapplikation  $C_{\max}$  und AUC sehr gut mit dem Mittelwert übereinstimmen, liegen diese Werte im Testschema knapp 50 % niedriger. Ähnlich hohe Abweichungen der individuellen Bioverfügbarkeit wurden bereits von anderen Generika berichtet (Schroeder et al. 1998). Ein Dosierungsfehler ist ausgeschlossen, da die Einnahme der Kapseln unter Aufsicht erfolgte. Möglicherweise löste sich eine Kapsel im Gastrointestinaltrakt nicht oder zu spät auf, so dass der Wirkstoff nur aus einer Kapsel freigesetzt wurde.

Die Daten dieses Versuchs stehen nicht im Einklang mit einer Studie an 18 gesunden Probanden, in der ebenfalls der Nahrungseinfluss auf die Bioverfügbarkeit von Cicloral<sup>®</sup> Kapseln untersucht wurde (Hexal AG 1997). Dort ergab sich bei Einnahme von 200 mg Cicloral<sup>®</sup> nach einer Standardmahlzeit eine Kinetik analog zu Optoral (Mueller et al. 1994 a), d.h. eine Reduktion von  $C_{\max}$  und AUC. Der zweigipfelige Verlauf des Konzentrations-Zeit-Diagramms weicht davon jedoch ab und ist in der Literatur mehrfach für die alte Formulierung Sandimmun<sup>®</sup> beschrieben (Reymond et al. 1988, Gupta und Benet 1989, Mueller et al. 1994 a). Das Auftreten von zwei Maxima kann durch eine schnelle Resorption von Ciclosporin aus den oberen Dünndarmabschnitten mit einer nachfolgenden, verzögerten Aufnahme von im Darmlumen verbliebenem Wirkstoff aus dem Ileum bedingt sein (Cakaloglu et al. 1993). Eine zweite Erklärung für den Kurvenverlauf der Hexal-Studie wäre eine inhomogene Probandenpopulation in der ein Teil bei Einnahme von Cicloral<sup>®</sup> nach dem Essen ein unverändertes, der andere Teil ein verzögertes  $t_{\max}$  aufweist. Die stark differierenden Daten aus der Studie an 18 Probanden und der Studie CIC-BV-1 untermauern die hohe Variabilität der Bioverfügbarkeit von Ciclosporin.

### 5.5.2 Korrelation zwischen Ciclosporin-Spiegeln und der $AUC_{0-4h}$

Aufgrund des schmalen therapeutischen Fensters von Ciclosporin ist eine möglichst optimale Einstellung der Patienten unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunsuppression. Die exakte Dosierung anhand einer Kinetik über den gesamten Zeitraum von 12 Stunden, wie auch einer Kurzkinetik zum Beispiel über 4 Stunden, ist aufwendig und konnte sich in der klinischen Routine nicht durchsetzen (Oellerich und Armstrong 2002). Die Dosisfindung erfolgt deshalb mit Hilfe der Messung einer einzelnen Blutkonzentration, zumeist des Talspiegels (Oellerich et al. 1995). Johnston und Kollegen konnten zeigen, dass bei Optoral die höchste inter- und intraindividuelle Variabilität in den ersten 4 Stunden nach Einnahme vorliegt. Die Bestimmung eines vollständigen AUC-Profiles, welches auch die Zeitspanne mit geringer Schwankung von 6 bis 12 Stunden erfasst, würde eventuell zu einer ‚Normalisierung‘ von Unterschieden führen (Johnston et al. 2000). Die Erkenntnis, dass der Blutspiegel 2 Stunden nach Einnahme der Medikation ( $C_2$ ) deutlich besser mit der  $AUC_{0-4h}$  korreliert als der Talspiegel ( $C_0$ ) führte zur Implementierung des so genannten  $C_2$ -Monitorings. Entsprechend wurden in zahlreichen klinischen Studien wie auch in der vorliegenden Arbeit die Ciclosporin-Spiegel zu bestimmten Zeitpunkten auf die  $AUC_{0-4h}$  bezogen (Belitzky et al. 2000).

Die höchste Korrelation in der Studie CIC-BV-1 lag mit  $r = 0,85$  im Testschema 2 Stunden nach Einnahme von Cicloral<sup>®</sup> vor, während dies im Referenzschema bei  $C_1$  ( $r = 0,81$ ) der Fall war. Die Korrelation 12 Stunden nach Einnahme, entsprechend dem Talspiegel bei einem 12 Stunden-Dosierungsintervall, erreichte mit ca.  $r = 0,5$  in Test und Referenz ein deutlich niedrigeres

Niveau und bestätigt somit die Kritik an der Dosierung nach Talspiegeln (Cole 2000, Levy 2001). Beim Vergleich dieser single-dose Studie an gesunden Probanden mit multiple-dose Studien an Transplantierten unter Therapie mit Optoral ergeben sich bei Optoral auffallend bessere Korrelationen zwischen  $C_2$  und  $AUC_{0-4h}$ . Die Resultate waren bei Lebertransplantierten  $r = 0,92$  (Cantarovich et al. 1998 a), bei Nierentransplantierten  $r = 0,90$  (Mahalati 1999) und bei Herztransplantierten  $r = 0,91$  (Cantarovich et al. 1998 b). Die vorliegenden Korrelationen von  $C_2$  zur  $AUC_{0-4h}$  von  $r = 0,85$  im Test- und  $r = 0,69$  im Referenzschema zeigen nicht nur eine geringere Übereinstimmung vor allem nach Nüchternapplikation, sondern auch eine nicht unerhebliche Variabilität. Beides kann die Dosierungsgenauigkeit und damit auch den Therapieerfolg negativ beeinflussen. Inwiefern der Einsatz des  $C_2$ -Monitorings bei Cicloral<sup>®</sup> vertretbar ist muss erst in multiple-dose Studien an Patienten geklärt werden.

### 5.5.3 Metabolisierung von Ciclosporin

Ciclosporin unterliegt einer komplexen Metabolisierung in der Leber aber auch im Gastrointestinaltrakt (Christians und Sewing 1993, 1995). Als Hauptmetaboliten im Blut von Patienten sind AM1 und AM9 aber auch AM4N nachweisbar (Kovarik et al. 1994 a).

Sekundäres Ziel der Studie CIC-BV-1 war die Bestimmung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs der Metaboliten AM1, AM9, AM4N und AM1c im Vollblut und im Urin der Probanden. Die Analyse der Metaboliten und der Muttersubstanz erfolgte per HPLC, die zwar zeitaufwendig aber auch sehr genau und spezifisch ist (Oellerich und Armstrong 2002). Immunochemische Methoden, die in der klinischen Routine weit verbreitet sind, weisen oft beträchtliche Schwankungen in der Präzision und Richtigkeit auf (Schütz et al. 1998, Steimer 1999, Holt et al. 2000). Die für diese Studie entwickelte HPLC-Methode gewährleistete die gemeinsame Messung von Ciclosporin und mehrerer Metaboliten in einer relativ kurzen Laufzeit von 22 Minuten. Die Intraassay-Variation war mit ca. 8 % ebenso zufriedenstellend wie die Richtigkeit für Ciclosporin. Die Metaboliten wurden dagegen mit maximal 40 % falsch hoch bestimmt. In der Studie waren aber weniger die Absolutkonzentrationen der Metaboliten als der Vergleich der Werte zwischen den beiden Applikationsarten von Relevanz, so dass diese Ungenauigkeit zu tolerieren war. Als Ursachen für die Probleme bei der Messung der Metaboliten kommen Einwiegefehler bei den, aus einem Fremdlabor stammenden Metaboliten-Stammlösungen wie auch deren lange Lagerzeit (über ein Jahr) in Frage. Der Metabolit AM4N konnte aufgrund interferierender Substanzen in den Proben (siehe Abbildung 11) nicht quantifiziert werden. Dieses Problem wurde bereits früher beschrieben (Christians et al. 1991). Die Maximalkonzentrationen von AM1 und AM9 im Vollblut lagen in beiden Behandlungsschemen einheitlich bei ca. 325 ng/ml.  $t_{max}$  wurde übereinstimmend nach etwa 2,25 Stunden erreicht. AM1 verzeichnete gegenüber AM9 eine etwa dreifach höhere Halbwertszeit und Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Kovarik et al. 1994 a). Insgesamt waren die kinetischen Parameter der Metaboliten im Vollblut beim Vergleich von Test und Referenz annähernd identisch, bei gleichzeitig deutlichem Unterschied bei Ciclosporin. Nach Nüchternapplikation von Cicloral<sup>®</sup> waren demnach trotz geringerer Bioverfügbarkeit von Ciclosporin ähnlich hohe Metabolitenkonzentrationen wie bei Einnahme nach dem Frühstück zu finden. Die signifikante Verringerung der Metabolisierungsrate, gemessen an den Blutspiegeln, im Zusammenhang mit einer Mahlzeit lässt sich mit einer Auslastung der Enzymkapazität durch die Nahrungsaufnahme erklären. Somit wäre nur eine eingeschränkte Metabolisierung des Ciclosporins möglich (Lindberg-Freij und Karlsson 1994). Inwiefern sich eine veränderte Metabolisierungsrate auf das klinische Ergebnis auswirkt ist fraglich. Einerseits wird vor allem AM1 mit Nephrotoxizität bei Patienten in Verbindung gebracht (Rosano et al. 1988, Furlanut et al. 1996), andererseits

wurde auch eine leicht immunsuppressive Wirkung postuliert (Sadeg et al. 1993). Eine Überwachung der Metabolitenkonzentrationen hat sich in der Klinik jedoch noch nicht etabliert. Analog den Blutkonzentrationen der Metaboliten war auch im Urin die Wiederfindung bei AM1 am höchsten. Neben AM1 und AM9 war im Urin auch der Metabolit AM1c nachweisbar, der im Vollblut nur sporadisch vorkam. Die Wiederfindung der Muttersubstanz aus Cicloral® lag mit knapp 0,4 % über der für Sandimmun® Optoral beschriebenen Wiederfindung von 0,1 % (Novartis Pharma 2002).

Die im Test belegte größere Bioverfügbarkeit von Ciclosporin im Vollblut sowie die höheren Konzentrationen von Ciclosporin und Metaboliten im Urin deuten klar auf eine verbesserte Resorption von Cicloral® nach einer fettreichen Mahlzeit hin und sind nur zum Teil Folge einer veränderten Metabolisierung. Es ist jedoch zu beachten, dass Ciclosporin nach oraler Gabe vorwiegend biliär und nur zu einem sehr geringen Teil (ca. 6 %) renal eliminiert wird (Novartis Pharma 2002).

#### **5.5.4 Einfluss von Ciclosporin im Test- und Referenzschema auf die Plasmaspiegel von Cortisol und Cortison**

Die Durchführung der Analyse der Cortisol- und Cortison-Plasmaspiegel erfolgte mittels einer neu entwickelten HPLC-Methode, die eine gleichzeitige Messung von Cortisol und Cortison über den internen Standard Methylprednisolon erlaubt. Der Variationskoeffizient (CV) für die Präzision war ca. 20 %, die Abweichung vom wahren Wert (Bias) besser als 10 %. Die Präzision war bei den niedrig dotierten Kontrollen etwas vermindert, da hier die endogenen Mengen an Cortisol und Cortison nur geringfügig aufgestockt wurden. Aus technischen Gründen wurde auf die Herstellung sogenannter ‚stripped-off Kontrollen‘ verzichtet, bei denen endogenes Cortisol mit Aktivkohle und hochtourigem Zentrifugieren entfernt wird (Jusko et al. 1994).

Wie bereits in der Pilotstudie EON-CIC-BV-1 so ist auch hier der Einfluss von Nahrung auf die Glucocorticoidspiegel deutlich zu erkennen (Hansen et al. 1997, Svec und Shawar 1997). Im Referenzschema stiegen die Konzentrationen im Anschluss an den Verzehr des fettarmen Frühstücks (2 Stunden nach Medikationseinnahme) signifikant an. Das gemeinsame Mittagessen führte entsprechend zu einem Anstieg sowohl im Test als auch in der Referenz. Bei der, aus der Studie EON-CIC-BV-1 übernommenen Kontrolle wurde das Mittagessen bereits 4 Stunden nach Medikation verzehrt. Im Kurvenverlauf findet sich der postprandiale Peak entsprechend früher. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Cortisolspiegel im Test nach Einnahme des fettreichen Frühstücks nur geringfügig über denen der Referenz (keine Nahrungsaufnahme zu diesem Zeitpunkt) liegen. Analog dem signifikanten Anstieg nach fettarmem Frühstück wäre auch hier ein stärker ausgeprägter Unterschied zu erwarten gewesen. Darüber hinaus fallen die Cortisonkonzentrationen nach Verzehr des fettreichen Frühstücks gegenüber der Referenz sogar signifikant ab. Inwiefern der Fettgehalt der Nahrung die Ausschüttung von Cortisol und Cortison beeinflusst ist nicht geklärt. In einer Probandenstudie an 14 prämenopausalen Frauen konnte ein leichter Rückgang der Cortisolspiegel unter einer Diät mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren gegenüber einer Diät mit vorwiegend gesättigten Fettsäuren festgestellt werden (Brown et al. 2002). Das in der vorliegenden Studie verwendete fettreiche Frühstück bestand jedoch hauptsächlich aus gesättigten Fettsäuren. Bei Sportlern war außerdem ein Anstieg der Cortisolkonzentration nach einer vierwöchigen fettreichen (40 % der Gesamtenergie) Diät im Vergleich zu einer 15 %- und einer 30 %-Diät zu verzeichnen (Venkatraman et al. 2001). Die gesteigerte Bioverfügbarkeit von Cicloral® bei Applikation nach einer Mahlzeit könnte zu einem Abfall der Cortisolspiegel geführt haben, der durch einen postprandialen Anstieg maskiert wurde. Eine Absenkung der Cortisolkonzentration nach Ciclosporin-Gabe stünde allerdings im Widerspruch zu Erkenntnissen aus einem Versuch an Kaninchen, in dem Ciclosporin in

verschiedenen Dosierungen zu einer Erhöhung der Cortisolspiegel führte (Cufer et al. 1995). Die Werte für Cortisol lagen in beiden Behandlungsschemen zu jedem Zeitpunkt innerhalb der Normgrenzen von ca. 25 – 175 ng/ml (Mutschler 2001), so dass bei einmaliger Gabe von Ciclosporin keine klinisch relevanten Veränderungen der Cortisolspiegel festzustellen waren.

### **5.5.5 Einfluss von Ciclosporin im Test- und Referenzschema auf vasodilatatorische und –konstriktorische Mediatoren**

Die chronische Anwendung von Ciclosporin ist häufig mit Hypertonie und Nephrotoxizität verbunden (Hardy et al. 2000). Bei der Entstehung dieser unerwünschten Nebenwirkungen ist eine durch Ciclosporin induzierte Vasokonstriktion beteiligt, die auf eine Dysbalance vasokonstriktorischer und vasodilatatorischer Mediatoren zurückzuführen ist (Bennett 1996, Andoh und Bennett 1998, Olyaei et al. 1999, Darlametsos und Varonos 2001). Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 (Textor et al. 1995, Lo Russo et al. 1996), Angiotensin –2 (Lee 1997) und Thromboxan A<sub>2</sub> (Braun-Dullaeus et al. 1999, Averna et al. 2001) werden vermehrt, vasodilatierende Prostaglandine (Koivisto et al. 1992, Textor et al. 1995) und NO (Attur et al. 2000, Oriji 2003) vermindert gebildet.

In dieser Studie wurden die Urinkonzentrationen von Thromboxan B<sub>2</sub> (Hauptmetabolit von Thromboxan A<sub>2</sub>), 6-keto Prostaglandin F<sub>1α</sub> (Hauptmetabolit von Prostacyclin) und Nitrit/Nitrat (Abbauprodukte von NO) in Abhängigkeit von der Gabe von Ciclosporin nach einer fettreichen Mahlzeit bzw. nüchtern untersucht. Die Konzentrationen von Thromboxan B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) variierten im Verlauf des ersten Kinetiktages, mit maximalen Werten am Vormittag und minimalen während der Nacht. 6-keto PGF<sub>1α</sub> hatte einen analogen Verlauf. Für beide Metaboliten ist entsprechend ein circadianer Rhythmus postuliert (Nadler und Yamamoto 1986, Kunkel et al. 1988). In der Urinfraktion 4-8 h nach Einnahme von Cicloral<sup>®</sup> waren die TxB<sub>2</sub>-Werte im Test signifikant höher als in der Referenz. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich keine signifikanten Abweichungen. Die Kontrollfraktionen wurden allerdings wenige Wochen nach Durchführung der Studie von, nicht mit den Probanden identischen Personen gesammelt. Dies birgt das Risiko eines tagesabhängigen Fehlers. In den Fraktionen 8-48 h nach Ciclosporin-Applikation waren keine Differenzen zwischen Test und Referenz festzustellen. Auch zwischen Tag 1 und 2 innerhalb eines Behandlungsschemas gab es keine Abweichungen. Die höhere Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Cicloral<sup>®</sup> bei Einnahme nach einem fettreichen Essen könnte demnach einen kurzfristig gesteigerten vasokonstriktorisches Effekt im Vergleich zur Nüchterneinnahme auslösen.

6-keto PGF<sub>1α</sub> und Nitrit/Nitrat waren gegenüber den Kontrollen tendenziell erniedrigt, wenngleich keine Signifikanz zwischen Test und Referenz vorlag. Das Ungleichgewicht von dilatierenden und konstringierenden Komponenten spiegelt sich im Trend zu erniedrigten Konzentrationen von 6-keto PGF<sub>1α</sub> und Nitrit/Nitrat in Verbindung mit erhöhten Werten für TxB<sub>2</sub> wider.

Eine negative Beeinflussung der Nierenleistung durch Ciclosporin lässt sich anhand der signifikanten Reduktion der Kreatinin-Clearance nach Ciclosporin-Gabe im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Studienbeginn belegen. Der Effekt trat in beiden Behandlungsgruppen am zweiten Tag auf. Dies deutet auf eine verzögert einsetzende Wirkung hin. Die gesteigerte Bioverfügbarkeit von Cicloral<sup>®</sup> nach fettreichem Essen schlug sich im Vergleich zur Referenz nicht in den Kreatininwerten nieder. Die Konzentrationen von Kreatinin im Plasma und Urin, sowie die Kreatinin-Clearance lagen während der Studie und bei der Nachuntersuchung gänzlich innerhalb der anerkannten Normbereiche.

## 6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Cyclosporine Capsules zeigten in vitro ein von Gengraf™ und Sandimmun® Optoral verschiedenes Verhalten mit einer signifikant höheren Adhäsion an das isolierte Rattenileum.

Ciclosporin aus in Wasser gelösten Kapseln adsorbierte bei Optoral nicht an Glas, bei Sandimmun® dagegen sehr deutlich. Auch Cyclosporine Capsules und Cicloral® offenbarten im Vergleich zu Optoral eine signifikante Adsorption.

Ciclosporin aus Cicloral® Trinklösung und Optoral Trinklösung adsorbierte im Laufe von 4 Stunden nicht an Glas.

Bei Applikation von Cyclosporine Capsules und Optoral mit Wasser wurde bei Ratten eine signifikant höhere mittlere AUC und Maximalkonzentration gefunden als nach Gabe mit Olivenöl. Beim Vergleich der beiden Formulierungen nach Applikation mit Wasser ergab sich ein deutlicher Trend zu einer größeren Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aus Optoral.

Cyclosporine Capsules und Cicloral® hatten bei gesunden Probanden eine annähernd identische Bioverfügbarkeit und Metabolisierung.

Bei Einmalgabe an gesunde Probanden zeigte Ciclosporin keinen Effekt auf die Cortisol- und Cortisonkonzentrationen sowie auf Blutdruck und Herzfrequenz.

Cicloral® wies bei Einnahme nach einer fettreichen Mahlzeit eine signifikant erhöhte Bioverfügbarkeit im Vergleich zur Nüchterneinnahme auf. Zwischen beiden Applikationsarten konnte Bioäquivalenz nicht nachgewiesen werden.

Gemessen an den Blutspiegeln von Ciclosporin und Metaboliten war die Metabolisierungsrate bei Einnahme nach einer fettreichen Mahlzeit signifikant erhöht.

Die Einmalgabe von Ciclosporin nach einer fettreichen Mahlzeit führte zu einem signifikanten Anstieg der Urinkonzentration von Thromboxan B<sub>2</sub> im Vergleich zur Nüchterneinnahme.

## 7. Schlussfolgerungen

Die Mikroemulsionstechnologie von Sandimmun® Optoral ist dem klassischen Sandimmun® unter anderem bezüglich der Therapieresultate deutlich überlegen. Es ermöglicht darüber hinaus aufgrund seiner konstanteren Bioverfügbarkeit eine einfachere Handhabung in der klinischen Anwendung. Auf den Markt drängende Ciclosporin-Generika müssen sich deshalb an der optimierten Galenik des Optorals messen lassen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Generika wiesen hinsichtlich der Galenik zum Teil deutliche Unterschiede auf, die sich in ihrem physiko-chemischen Verhalten niederschlagen. In wieweit diese Abweichungen auf den Therapieerfolg Einfluss nehmen können, müssen Langzeitbeobachtungen an Patienten klären, in denen ein Teil des Kollektivs 1:1 auf das Generikum umgestellt und der andere Teil unter Optoral belassen wird. Dieses Studiendesign würde die beste Möglichkeit eines Vergleichs der therapeutischen Äquivalenz bieten. Dabei wäre eine engmaschige Kontrolle der Korrelation der C<sub>2</sub>-Spiegel mit der AUC<sub>0-4h</sub> und gegebenenfalls Dosisadaptation von Cicloral® zu fordern.

Die vorliegenden Daten bestätigen die Abhängigkeit der Resorption von Ciclosporin von der Nahrung. Das ciclosporinhaltige Arzneimittel Cicloral® ist bei Einnahme nach einer fettreichen Mahlzeit nicht bioäquivalent zur Nüchterneinnahme, bei gleichzeitig erhöhter Variabilität. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte in die Fachinformation bzw. die Packungsbeilage von Cicloral® ein Hinweis aufgenommen werden, der die Einnahme des Medikaments einheitlich in bezug zu Mahlzeiten empfiehlt. Da eine gesteigerte Variabilität der Bioverfügbarkeit von Ciclosporin mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht, ist die Applikation vor den Mahlzeiten anzumahlen. Sollte aufgrund der dann niedrigeren Bioverfügbarkeit eine Dosiserhöhung nötig sein, wäre der wirtschaftliche Vorteil der Generikaanwendung eventuell verloren. Für Generika, die Wirkstoffe enthalten, deren Pharmakokinetik bekanntermaßen von der Nahrungsaufnahme beeinflusst werden kann oder die der Gruppe der critical dose drugs angehören, sollte die Durchführung einer Studie zur Erfassung der Nahrungsabhängigkeit in die Zulassungsanforderungen mit aufgenommen werden. Der angedachte Nachweis einer individuellen Bioäquivalenz bei Ciclosporin scheint aufgrund der Einzeldaten dieser Arbeit sinnvoll. Der Einfluss von Nahrung auf die Bioverfügbarkeit war uneinheitlich, mit zum Teil drastischen Abweichungen der individuellen von der mittleren Bioverfügbarkeit.

Ein entscheidender Schritt zur Verbesserung der Ciclosporin-Therapie wird die Aufklärung der Mechanismen sein, die bei der Entstehung der unerwünschten Wirkungen zugrunde liegen. Bei der ciclosporininduzierten Nephrotoxizität schient das direkte Eingreifen von Ciclosporin in die Regulation der Cyclooxygenasen eine wichtige Rolle zu spielen. Darüber hinaus ist, wie auch bei der ciclosporinbedingten Hypertonie, das Gleichgewicht zwischen vasokonstriktorisches und – dilatatorischen Mediatoren relevant. Gerade eine effektives medikamentöses Eingreifen in die Entstehung und Persistenz der Nephrotoxizität könnte dazu beitragen, die Langzeitergebnisse vor allem in der Nierentransplantation zu verbessern.

Der Einsatz der HPLC als Analysesystem ist für die klinische Routine zu zeitaufwendig. Die verschiedenen, schnell und einfach zu handhabenden Radioimmunoassays (RIA) liefern jedoch zum Teil stark schwankende Ergebnisse, die auf uneinheitliche Kreuzreaktionen mit Ciclosporin-Metaboliten zurückzuführen sind. Dies erschwert die Dosisfindung wie auch die Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Zentren bzw. Laboratorien. Hier gilt es, spezifischere und ausreichend schnelle Analysemethoden für die Bestimmung der Blutkonzentrationen von Ciclosporin zu entwickeln.



## 8. Literatur

- Akiyama T, Yamazaki T** (2001) Effects of right and left vagal stimulation on left ventricular acetylcholine levels in the cat. *Acta Physiol Scand*, 172: 11-16
- Alexander DR, Hexham JM, Crumpton MJ** (1988) The association of type 1, type 2A and type 2B phosphatases with the human T lymphocyte plasma membrane. *Biochem J*, 256: 885-892
- Ammouche A, Dinh L, Youyou A, Clement M, Bourre JM** (1993) Rate of alteration of hepatic mixed-function oxidase system in rats fed different dietary fats. *Biochem Cell Biol*, 71: 530-537
- Andoh TF, Bennett WM** (1998) Chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 7: 265-270
- Attur MG, Patel R, Thakker G, et al.** (2000) Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflamm Res*, 49: 20-26
- Averna M, Barbagallo CM, Ganci A, et al.** (2001) Determinants of enhanced thromboxane biosynthesis in renal transplantation. *Kidney Int*, 59: 1574-1579
- Bai S, Liu J, Lu SK, Brunner LJ** (2001 a) In vivo induction of hepatic p-glycoprotein by cyclosporine in the rat. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 109: 103-114
- Bai S, Brunner LJ, Stepkowski SM, Napoli KL, Kahan BD** (2001) Effect of low dose cyclosporine and sirolimus on hepatic drug metabolism in the rat. *Transplantation*, 71: 1585-1592
- Barr WH** (1999a) Scientific and professional concerns regarding product interchange and subsequent monitoring of cyclosporine and other critical dose drugs. *Transplant Proc*, 31: 1645-1648
- Barr WH** (1999b) The case for expanding bioequivalence criteria to include measures of individual bioequivalence in relevant population subsets. *Transplant Proc*, 31: 25S-30S
- Belitsky P, Levy GA, Johnston A** (2000) Neoral absorption profiling: an evolution in effectiveness. *Transplant Proc*, 32 suppl 3A: 45S-52S
- Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wacher VJ** (1999) Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release*, 62: 25-31
- Bennett WM** (1996) Insights into chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 34: 515-519
- Bjorkman PJ, Super MA, Samraoui B, et al.** (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature*, 329: 506-512
- Blouin RA, Warren GW** (1999) Pharmacokinetic considerations in obesity. *J Pharm Sci*, 88: 1-7
- Blume H, Mutschler E** (1989) Vergleichende Bewertung analog zusammengesetzter Fertigarzneimittel. Govi-Verlag, Frankfurt
- Braun-Dullaes RC, Feussner M, Walker G, et al.** (1999) Cyclosporine-induced coronary artery constriction – dissociation between thromboxane release and coronary vasospasm. *J Heart Lung Transplant*, 18: 328-335
- Brown BD, Thomas W, Hutchins A, Martini MC, Slavin JL** (2002) Types of dietary fat and soy minimally affect hormones and biomarkers associated with breast cancer risk in premenopausal women. *Nutr Cancer*, 43: 22-30
- Brown JH, Jardetzky T, Super MA, et al.** (1988) A hypothetical model of the foreign antigen binding site of the class II histocompatibility molecules. *Nature*, 332: 845-850
- Brozmanova H, Grundmann M, Safarik K, Jegorov A** (2000) High-performance liquid chromatographic method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine A and its two metabolites in renal transplant patients. *J Chrom B*, 749: 93-100
- Brunkwall J, Bergqvist D** (1993) The effect of cyclosporine A dissolved in chremophore or in ethanol and of cortisone on the arterial release of prostacyclin. *J Surg Res*, 55: 622-627
- Brunner LJ, Bennet WM, Koop DR** (1996) Selective suppression of rat hepatic microsomal activity during chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, 277: 1710-1718
- Brunner LJ, Bai S** (2000) Effect of dietary oil intake on hepatic cytochrome P450 activity in the rat. *J Pharm Sci*, 89: 1022-1027
- Brunner LJ, Werner U, Gravenall CE** (2000) Effect of dose on cyclosporine-induced suppression of hepatic cytochrome P450 3A2 and 2C11. *Eur J Pharm Biopharm*, 49: 129-135

- Brynskov J, Freund L, Campanini MC, et al.** (1992) Cyclosporine pharmacokinetics after intravenous and oral administration in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*, 27: 961-967
- Burdick JF** (2001) A general approach to broader sharing in organ allocation. *Transplantation*, 72: 759-763
- Cakaloglu Y, Marinos G, Marsden J, Peters TJ, Williams R, Tredger JM** (1993) Localization of cyclosporin A absorption in rat small bowel and the effect of bile. *Clinical Science*, 84: 675-679
- Cantarovich M, Barkun JS, Tchervenkov JI, Besner JG, Aspeslet L, Metrakos P** (1998 a) Comparison of Neoral dose monitoring with cyclosporine trough levels versus 2-hr postdose levels in stable liver transplant patients. *Transplantation*, 66: 1621-1627
- Cantarovich M, Besner JG, Barkun JS, Elstein E, Loertscher R** (1998 b) Two-hour cyclosporine level determination is the appropriate tool to monitor Neoral therapy. *Clin Transplant*, 12: 243-249
- Carter BL, Noyes MA, Demmler RW** (1993) Differences in serum concentrations of and response to generic verapamil in the elderly. *Pharmacotherapy*, 13: 359-368
- Chapman JR, O'Connell PJ, Bovington KJ, Allen Rd** (1996) Reversal of cyclosporine malabsorption in diabetic recipients of simultaneous pancreas and kidney transplant using a microemulsion formulation. *Transplantation*, 61: 1699-1704
- Christians U, Zimmer KO** (1987) Measurement of cyclosporin and of four metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography*, 413: 121-129
- Christians U, Strohmeyer S, Kownatzko R, et al.** (1991 a) Investigation on the metabolic pathways of cyclosporine: II. Elucidation of the metabolic pathways in vitro by human liver microsomes. *Xenobiotica*, 21: 1199-1210
- Christians U, Kohlhaw K, Budniak J, et al.** (1991 b) Cyclosporin metabolite pattern in blood and urine of liver graft recipients. *Eur J Clin Pharmacol*, 41: 285-290
- Christians U, Kohlhaw K, Budniak J, et al.** (1991 c) Cyclosporin metabolite pattern in blood and urine of liver graft recipients. *Eur J Clin Pharmacol*, 41: 291-296
- Christians U, Sewing KF** (1993) Cyclosporine metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther*, 57: 291-345
- Christians U, Sewing KF** (1995) Alternative cyclosporine metabolic pathways and toxicity. *Clin Biochem*, 28: 547-559
- Christians U, First MR, Benet LZ** (2000) Recommendations for bioequivalence testing of cyclosporine generics revisited. *Ther Drug Monit*, 22: 330-345
- Clapham DE** (1995) Calcium signaling. *Cell*, 80: 259-268
- Clipstone NA, Crabtree GR** (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 357: 695
- Cole E, Cheung F, Wong P** (1989) Toxic effects on renal cells in culture - a comparison of cyclosporine A and its metabolites. *Transplant Proc*, 21: 943-945
- Cole E, Keown P, Landsberg D, et al.** (1998) Safety and tolerability of cyclosporine and cyclosporine microemulsion during 18 months of follow-up in stable renal transplant recipients: a report of the Canadian Renal Study Group. *Transplantation*, 65: 505-510
- Cole EH** (2000) Neoral monitoring: limitations of trough level monitoring and the potential role of limited sampling strategies. *Transplant Proc*, 32: 1556-1558
- Corbo DC, Liu JC, Chien YW** (1990) Characterization of the barrier properties of mucosal membranes. *J Pharm Sci*, 79: 202-206
- CTS (Collaborative Transplant Study)** (2001) Newsletter 1:2001. Abrufbar über [cts.med.uni-heidelberg.de](http://cts.med.uni-heidelberg.de)
- Cufer T, Vrhovec I, Skrk J, Pfeifer M, Pajk B, Zakotnik B, Filipic B, Rode B, Sikic BI** (1995) Cyclosporine A increases serum cortisol levels in rabbits. *Anti-Cancer Drugs*, 6: 615-618
- Cufer T, Vrhovec I, Pfeifer M, Skrk J, Borstnar S, Sikic BI** (1998) Effect of the multidrug resistance modulator valspodar on serum cortisol levels in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol*, 41: 517-521
- Cufer T, Pfeifer M, Vrhovec I, Frangež R, Kosec M, Mrhar A, Grabnar I, Golouh R, Vogric S, Sikic BI** (2000) Decreased cortisol secretion by adrenal glands perfused with the P-glycoprotein inhibitor valspodar and mitotane or doxorubicin. *Anticancer Drugs*, 11: 303-309

- Danovitch GM** (2001) Immunosuppressive medications and protocols for kidney transplantation. In Danovitch GM: Handbook of kidney transplantation, 3. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
- Darlametsos IE, Varonos DD** (2001) Role of prostanoids and endothelins in the prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 64: 231-239
- Dias VC, Madsen KL, Mulder KE, Keelan M, Yatscoff RW, Thomson AB** (1998) Oral administration of rapamycin and cyclosporine differentially alter intestinal function in rabbits. *Dig Dis Sci*, 43: 2227-2236
- Drewe J, Beglinger C, Kissel T** (1992) The absorption site of cyclosporine in the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol*, 33: 39
- Eisen HJ, Hobbs RE, Davis SF** (1999) Safety, tolerability and efficacy of cyclosporine microemulsion in heart transplant recipients: a randomized, multicenter, double-blind comparison with the oil based formulation of cyclosporine- -results at six months after transplantation. *Transplantation*, 68: 663-671
- EMA** (2001) Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP): Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence, 26. Juli 2001
- EonLabs** (1999) Full Prescribing Information: Cyclosporine Capsules, USP (modified)
- Ericzon BG, Todo S, Lynch S** (1987) Role of bile and bile salts in cyclosporine absorption in dogs. *Transplant Proc*, 19: 1248-1249
- Fahr A** (1993) Cyclosporine clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 24: 472-495
- Farber L, Maibucher A, Geissler F, et al.** (1994) Favourable clinical results of Sandimmun Neoral in malabsorbing liver and heart transplant recipients. *Transplant Proc*, 26: 2988-2993
- FDA** (2001a) Guidance for industry: Food-effect bioavailability and fed bioequivalence studies: study design, data analysis, and labelling. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, October 2001 BP
- FDA** (2001b) Guidance for industry: statistical approaches to establishing bioequivalence. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, January 2001 BP
- FDA** (2002) Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products-general considerations. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, July 2002 BP
- Fraser ED, Walsh MP** (1995) Dephosphorylation of calponin by type 2B protein phosphatase. *Biochemistry*, 34: 9151-9158
- Freeman DJ** (1991) Pharmacology and pharmacokinetics of cyclosporine. *Clin Biochem*, 24: 9-14
- Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ** (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 3686-3690
- Furlanut M, Baraldo M, Galla F, Marzocchi V, Pea F** (1996) Cyclosporin nephrotoxicity in relation to its metabolism in psoriasis. *Pharm Res*, 33: 349-352
- Furuya KN, Gebhardt R, Schuetz EG, Schuetz JD** (1994) Isolation of rat pgp3 cDNA: evidence for gender and zonal regulation of expression in the liver. *Biochim Biophys Acta*, 1219: 636-644
- Gershanik T, Benzeno S, Benita S** (1998) Interaction of a self-emulsifying lipid drug delivery system with the everted rat intestinal mucosa as a function of droplet size and surface charge. *Pharm Res*, 15: 863-869
- Gershanik T, Benita S** (2000) Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 179-188
- Gilman JT** (1993) Carbamazepine toxicity resulting from generic substitution. *Neurology*, 43: 2696-2697
- Gossmann J, Radounikli A, Bernemann A, Schelinski O, Raab HP, Bickeböllner R, Scheuermann EH** (2001) Pathophysiology of cyclosporine-induced nephrotoxicity in humans: a role for nitric oxide? *Kidney Blood Press Res*, 24: 111-115
- Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J, Roy A, Murphy G, Tan A, Hendricks L, Guilbault N, Levy G** (1999) Peak cyclosporine levels ( $C_{max}$ ) correlates with freedom from liver graft rejection. *Transplantation*, 67: 1133-1137
- Grobecker HF, Riedel K, Wellenhofer T** (1995) CsA induced hypertension in SHR and WKY rats: role of the sympatho-adrenal system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22: S994-995

- Gruber A, Bjorkholm M, Brinch L, et al.** (2003) A phase I/II study of the MDR modulator Valspodar (PSC 833) combined with daunorubicin and cytarabine in patients with relapsed and primary refractory acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*, 27: 323-328
- Gudmundsdottir H, Turka LA** (1999) T cell costimulatory blockade: new therapies for transplant rejection. *J Am Soc Nephrol*, 10: 1356-1365
- Gupta SK, Benet LZ** (1989) Absorption kinetics of cyclosporine in healthy volunteers. *Biopharm Drug Dispos*, 10: 591-596
- Gupta SK, Manfro RC, Tomlanovic SJ, Gambertoglio JG, Garovoy MR, Benet LZ** (1990) Effect of food on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol*, 30: 643-653
- Häyry P** (1994) Molecular pathology of acute and chronic rejection. *Transplant Proc*, 26: 3280-3284
- Hall BM, Tiller DJ, Hardie I** (1988) Comparison of three immunosuppressive regimens in cadaver renal transplantation: long-term cyclosporine, short-term cyclosporine followed by azathioprine and prednisolone, and azathioprine and prednisolone without cyclosporine. *N Engl J Med*, 318: 1499-1507
- Haller GW, Winkler M, Bechstein WO, et al.** (1996) Absorption of cyclosporine Neoral early after liver transplantation: is it possible to abandon intravenous cyclosporine A application? *Transplant Proc*, 28: 2239-2240
- Halloran PF, Helms LMH, Kung L, Noujaim J** (1999) The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation*, 68: 1356-1361
- Hamwi A, Salomon A, Steinbrugger R, Fritzer-Szekeres M, Jager W, Szekeres T** (2000) Cyclosporine metabolism in patients after kidney, bone marrow, heart-lung and liver transplantation in the early and late posttransplant period. *Am J Clin Pathol*, 114: 536-543
- Hanauer SB, Present DH** (2003) The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord*, 3: 81-92
- Hansen JM, Johansen NJ, Mollerup HM, Fogh-Andersen N, Strandgaard S** (1999) Effects of nitric oxide blockade and cyclosporine A on cardiovascular and renal function in normal man. *J Hypertens*, 17: 1707-1713
- Hansen K, Sickelmann F, Pietrowsky R, Fehm HL, Born J** (1997) Systemic immune changes following meal intake in humans. *Am J Physiol*, 273: R548-553
- Hardy G, Stanke-Labesque F, Deveaux G, Devillier P, Sessa C, Bessard G** (2000) Cyclosporine A and chromophore EL induce contractions of human saphenous vein: involvement of thromboxane A<sub>2</sub> receptor-dependent pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36: 693-698
- Hashimoto Y, Sasa H, Shimomura M, Inui K** (1998) Effects of intestinal and hepatic metabolism on the bioavailability of tacrolimus in rats. *Pharm Res*, 15: 1609-1613
- Helderman JH, Goral S** (2001) Transplantation Immunobiology. In Danovitch GM: Handbook of kidney transplantation, 3. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
- Hemming AW, Greig PD, Cattral MS, et al.** (1996) A microemulsion of cyclosporine without intravenous cyclosporine in liver transplantation. *Transplantation*, 62: 1798-1802
- Henney JE** (2000) From the food and drug administration: nationwide recall of SangCya oral solution. *JAMA*, 284: 1234
- Hexal AG** (1996) A study in healthy volunteers to describe and compare the pharmacokinetics of cyclosporine in whole blood after p.o. administration of a single dose of 200 mg cyclosporine using a novel formulation and two commercial formulations for reference in order to explore relative differences of their in vivo pharmaceutical performance.
- Hexal AG** (1997) Cicloral<sup>®</sup> study 96-12-o-D-3; IPHAR No 96/308: A study in healthy volunteers to describe and compare the pharmacokinetics of cyclosporine in whole blood after the p.o. administration of single doses of 200 mg cyclosporine using a new capsule administered either in the fasting state (reference) or at the end of a standard meal (test).
- Hexal AG** (2000) Cicloral<sup>®</sup> study 2000-38-LSG-2, PIM 3016: An open, randomised two-period single-dose study to assess the bioequivalence of cyclosporine from two different oral solutions administered together with apple juice.
- Hexal AG** (2002) Fachinformation: Cicloral<sup>®</sup> 25 mg, 50 mg, 100 mg Kapseln

- Hinderling PH** (1997) Red blood cells: a neglected compartment in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacol Rev*, 49: 279-295
- Hocherl K, Dreher F, Vitzthum H, Kohler J, Kurtz A** (2002) Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol*, 13: 2427-2436
- Hooiveld G, van Montfoort JE, Meijer DKF, Müller M** (2000) Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur J Pharm Sci*, 12: 13-20
- Holt DW** (1978) Digoxin bioavailability. *Lancet*, 2: 1103
- Holt DW, Johnston A, Roberts NG, Tredger JM, Trull AK** (1994) Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring: report of the Association of Clinical Biochemists task force. *Ann Clin Biochem*, 31: 420-446
- Holt DW, Johnston A, Kahan BD, Morris RG, Oellerich M, Shaw LM** (2000) New approaches to cyclosporine monitoring raise further concerns about analytical techniques. *Clin Chem*, 46: 872-874
- Honcharik N** (1991) The effect of food on cyclosporine absorption. *Clin Biochem*, 24: 89-92
- Honcharik N, Yatscoff RW, Jeffery JR, Rush DN** (1991) The effect of meal composition on cyclosporine absorption. *Transplantation*, 52: 1087-1089
- Hoppu K** (1991) Evidence for pre-hepatic metabolism of oral cyclosporine in children. *Br J Clin Pharmacol*, 32: 477-481
- Humbert H, Guest G, Said MB, Cabiach MD, Gagnadoux MF, Niaudet P, Broyer M** (1994) Steady-state pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients: does an influence of age or body weight exist? *Transplant Proc*, 26: 2791-2797
- Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M** (2000) An essential role of the nuclear factor of activated T-cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, 275: 23627-23635
- Inoue S, Beck Y, Nagao T, Uchida H** (1994) Early fluctuation in cyclosporine A trough levels affects long-term outcome of kidney transplants. *Transplant Proc*, 26: 2571-2573
- Johnston A, Keown PA, Holt DW** (1997) Simple bioequivalence criteria: are they relevant to critical dose drugs? Experience gained from cyclosporine. *Ther Drug Mon*, 19: 375-381
- Johnston A, Holt DW** (1999) Bioequivalence criteria for cyclosporine. *Transplant Proc*, 31: 1649-1653
- Johnston A, David OJ, Cooney GF** (2000) Pharmacokinetic validation of Neoral absorption profiling. *Transplant Proc*, 32 suppl3A: 53S-56S
- Julien J, Farge D, Kreft-Jais C, Guyenne TT, Plouin PF, Houssin, Carpentier A, Corvol P** (1993) Cyclosporine-induced stimulation of the renin-angiotensin system after liver and heart transplantation. *Transplantation*, 56: 885-891
- Jusko WJ, Pyszczynski NA, Bushway MS, D'Ambrosio R, Mis SM** (1994) Fifteen years of operation of a high-performance liquid chromatographic assay for prednisolone, cortisol and prednisone in plasma. *J Chrom B*, 658: 47-54
- Kahan BD** (1989) Cyclosporine. *N Engl J Med*, 321: 1725-1738
- Kahan BD, Shaw LM, Holt D, Grevel J, Johnston A** (1990) Consensus document. Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc*, 22: 1357-1361
- Kahan BD, Dunn J, Fitts C, Van Buren D, Wombolt D, Pollak R, Carson R, Alexander JW, Choc M, Wong R, Hwang DS** (1995) Reduced inter- and intrasubject variability in cyclosporine pharmacokinetics in renal transplant recipients treated with a microemulsion formulation in conjunction with fasting, low-fat meals or high-fat meals. *Transplantation*, 59: 505-511
- Kahan BD, Welsh M, Schoenberg L** (1996) Variable oral absorption of cyclosporine. *Transplantation*, 62: 599-606
- Kahan BD** (1998) High variability of drug exposure: a biopharmaceutic risk factor for chronic rejection. *Transplant Proc*, 30: 1639-1641
- Kahan BD** (1999 a) Recommendations concerning generic formulations of cyclosporine. *Transplant Proc*, 31: 1634
- Kahan BD** (1999 b) Considerations concerning generic formulations of immunosuppressive drugs. *Transplant Proc*, 31: 1635-1641

- Kahan BD, Welsh M, Urbauer DL, Mosheim MB, Beusterien KM, Wood MR, Schoenberg LP, Dicesare J, Katz SM, van Buren CT** (2000 a) Low intraindividual variability of cyclosporin A exposure reduces chronic rejection incidence and health care costs. *J Am Soc Nephrol*, 11: 1122-1131
- Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A** (2000 b) Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Therapeutics*, 24: 1-21
- Kahn KH, Barenbrock M, Fritschka E, Heinecke A, Lippert J, Schroeder K, Hauser I, Wagner K, Neumayer HH** (1999) Effect of nitrendipine on renal function in renal transplant patients treated with cyclosporine: a randomised trial. *Lancet*, 354: 1415-1420
- Kane GC, Lipsky JJ** (2000) Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc*, 75: 933-942
- Kaplan B, Lown K, Craig R, Abecassis M, et al.** (1999) Low bioavailability of cyclosporine microemulsion and tacrolimus in a small bowel transplant recipient: possible relationship to intestinal P-glycoprotein activity. *Transplantation*, 67: 333-335
- Kasiske BL** (1997) Clinical correlates to chronic renal allograft rejection. *Kidney Int*, 63: S71-74
- Kasiske BL** (2001) Long-term posttransplantation management and complications. In Danovitch GM: Handbook of kidney transplantation, 3. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
- Katznelson S, Takemoto SK, Cecka JM** (2001) Histocompatibility testing, crossmatching, and allocation of cadaveric kidney transplants. In Danovitch GM: Handbook of kidney transplantation, 3. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
- Kees F, Ladenburger S, Wohlfart K** (2002) Standardarbeitsvorschrift zur Bestimmung von Cortisol und Cortison in Serum und Plasma mit Hilfe der HPLC. Universität Regensburg
- Keller H** (1991) Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis, 2. Aufl. Thieme Verlag Stuttgart
- Keown P, Niese D** (1998 a) Cyclosporine microemulsion increases drug exposure and reduces acute rejection without incremental toxicity in de novo renal transplantation. International Sandimmun Neoral Study Group. *Kidney Int*, 54: 938-944
- Keown P, Kahan BD, Johnston A, et al.** (1998 b) Optimization of cyclosporine therapy with new therapeutic drug monitoring strategies: report from the International Neoral® TDM Advisory Consensus Meeting (Vancouver, November 1997). *Transplant Proc*, 30: 1645-1649
- Keown P, Kiberd B, Baishaw R, et al.** (2001) Neoral C2 monitoring in renal transplantation: a cost-effective tool for improving graft survival. European Society of Transplantation, 6.-11.10.2001, Lissabon, Portugal [Abstract 440]
- Kew CE, Curtis JJ** (2000) The best way to manage hypertension after renal transplantation. *J Ren Nutr*, 10: 3-6
- Khoschorur G, Auer T, Lanzer G, Petritsch P, Holzer H, Tscheliessnigg KH** (1998) The determination of metabolite M17 and its meaning for immunosuppressive cyclosporin therapy. *Angiology*, 49: 307-314
- Kincaid RL, Takayama H, Billingsley ML, Sitkovsky MV** (1987) Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T-lymphocytes and thymocytes. *Nature*, 330: 176-178
- Kiyozaki H, Kobayashi E, Toyama N, Miyata M** (1996) Segmental small bowel transplantation in the rat: comparison of lipid absorption between jejunal and ileal grafts. *J Parenter Enteral Nutr*, 20: 67-70
- Koehler J, Kuehnel T, Kees F, Hoecherl K, Grobecker HF** (2002) Comparison of bioavailability and metabolism with two commercial formulations of cyclosporine A in rats. *Drug Metab Dispos*, 30: 658-662
- Koivisto Va, Leirisalo-Repo M, Pelkonen R, Turunen U, Rapola J, Viinikka L, Ylikorkala O** (1992) Cyclosporin reduces renal prostanoid excretion in type 1 diabetic patients. *Acta Diabetol*, 29: 1-5
- Kolars JC, Awni WM, Merion RM, Watkins PB** (1991) First pass metabolism of cyclosporin by the gut. *Lancet*, 338: 1488-1490
- Koomans HA, Ligtienberg G** (2001) Mechanisms and consequences of arterial hypertension after renal transplantation. *Transplantation*, 72 (6 suppl.): S9-12
- Kopp JB, Klotman PE** (1990) Cellular and molecular mechanisms of cyclosporine nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*, 1: 162-179

- Kovarik JM, Vernillet L, Mueller EA, Freiburghaus R, Niederberger W, Kutz K** (1994 a) Cyclosporine disposition and metabolite profiles in renal transplant patients receiving a microemulsion formulation. *Ther Drug Monit*, 16: 519-25
- Kovarik JM, Mueller EA, van Bree JB, et al.** (1994 b) Cyclosporine pharmacokinetics and variability from a microemulsion formulation: a multicenter investigation in kidney transplant patients. *Transplantation*, 58: 658-663
- Kovarik JM, Mueller EA, Richard F, et al.** (1996 a) Evidence for earlier stabilization of cyclosporine pharmacokinetics in de novo renal transplant patients receiving a microemulsion formulation. *Transplantation*, 62: 759-763
- Kovarik JM, Kurki P, Mueller E, et al.** (1996 b) Diclofenac combined with cyclosporine in treatment refractory rheumatoid arthritis: longitudinal safety assessment and evidence of a pharmacokinetic/dynamic interaction. *J Rheumatol*, 23: 2033-2038
- Kovarik JM, Barilla D, McMahon L, et al.** (2002) Administration diluents differentiate Neoral from a generic cyclosporine oral solution. *Clin Transplant*, 16: 306-309
- Kozaki M, Hirano T, Oka K** (1989) Postoperative endogenous cortisol levels as an index of acute rejection and severe infection in renal allograft recipients. *Transplant Proc*, 21: 1864-1866
- Krensky AM** (1997) The HLA-system, antigen-processing presentation. *Kidney Int*, 58: S2-7
- Kunkel G, Nigam S, Herold D, Jusuf L, Albright DL** (1988) Arachidonic acid metabolites and their circadian rhythm in patients with allergic bronchial asthma. *Chronobiol Int*, 5: 387-394
- La Rosa CA, Kimura K, Dresner E, Jaffe BM** (1989) Cyclosporine absorption by transplanted rat small intestine. *Transplantation*, 47: 736-738
- L'Azou B, Medina J, Frieauff W, et al.** (1999) In vitro models to study mechanisms involved in cyclosporine A-mediated glomerular contraction. *Arch Toxicol*, 73: 337-345
- Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH** (1990) The molecular basis of alloreactivity. *Immunology Today*, 11: 83-88
- Lee DB** (1997) Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int*, 52: 248-260
- Lemaire M, Fahr A, Maurer G** (1990) Pharmacokinetics of cyclosporine: inter- and intraindividual variations and metabolic pathways. *Transplant Proc*, 22: 1110-1112
- Le Thai B, Dumont M, Michel A, Erlinger S, Houssin D** (1988) Cholestatic effect of cyclosporine in the rat: an inhibition of bile acid secretion. *Transplantation*, 46: 510-512
- Levy GA** (1999) Relationship of pharmacokinetics to clinical outcomes. *Transplant Proc*, 31: 1654-1658
- Levy GA** (2001) C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the Neoral formulation. *Bio Drugs*, 15: 279-290
- Levy G, Thervet E, Lake J, Uchida K** (2002) Patient management by Neoral C<sub>2</sub> monitoring: an international consensus statement. *Transplantation*, 73: S12-18
- Lim KK, Su WP, Schroeter AL, et al.** (1996) Cyclosporine in the treatment of dermatologic disease: an update. *Mayo Clin Proc*, 71: 1182-1191
- Lindberg-Freij A, Karlsson MO** (1994) Dose dependent absorption and linear disposition of cyclosporine A in rat. *Biopharm Drug Dispos*, 15: 75-86
- Lindholm A, Henricsson S, Dahlqvist R** (1990) The effect of food and bile acid administration on the relative bioavailability of cyclosporin. *Br J Clin Pharmacol*, 29: 541-548
- Lindholm A** (1991) Factors influencing the pharmacokinetics of cyclosporine in man. *Ther Drug Monit*, 13: 465-477
- Lindholm A, Welsh M, Alton C, Kahan BD** (1992) Demographic factors influencing cyclosporine pharmacokinetic parameters in patients with uremia: racial differences in bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*, 52: 359-371
- Lindholm A, Kahan BD** (1993) Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 54: 205-218
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL** (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66: 807-815
- Liu J, Brunner LJ** (2001) Chronic cyclosporine administration induces renal P-glycoprotein in rats. *Eur J Pharmacol*, 418: 127-132
- Loh C, Shaw KT, Carew J, et al.** (1996) Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem*, 271: 10884-10891

- Lo Russo A, Passaquin AC, Andre P, Skutella M, Ruegg UT** (1996) Effect of cyclosporin A and analogues on cytosolic calcium and vasoconstriction: possible lack of relationship to immunosuppressive activity. *Br J Pharmacol*, 118: 885-892
- Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, Brown MB, Guo W, Watkins PB** (1997) Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest*, 99: 2545-2553
- Lu SK, Callahan SM, Brunner LJ** (2003) Suppression of hepatic CYP3A1/2 and CYP2C11 by cyclosporine is not mediated by altering growth hormone levels. *J Pharmacol Exp Ther*, 305: 331-337
- Luo C, Shaw KT, Raghavan A, et al.** (1996) Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8907-8912
- Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R** (1999) Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve. Its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation*, 68: 55-62
- Mahalati K, Belitsky P, West K, et al.** (2001) Approaching the therapeutic window for cyclosporine in kidney transplantation: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*, 12: 828-833
- Maurer G, Lemaire M** (1986) Biotransformation of cyclosporine and distribution in blood. *Transplant Proc*, 18: 25-34
- McGilveray IJ, Gallicano K** (1999) Generic drugs: the Canadian perspective. *Transplant Proc*, 31 (3A suppl.): S16-18
- Mehta M, Venkataramanan R, Burckart GJ** (1988) Effect of bile on cyclosporine absorption in liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*, 25: 579-584
- Meinzer A, Müller E, Vonderscher J** (1997) Perorale Mikroemulsionsformulierung – Sandimmun Optoral® / Neoral®. In Müller RH, Hildebrand GE: Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- Meyer MM, Munar M, Udeaja J, et al.** (1993) Efficacy of area under the curve cyclosporine monitoring in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 4: 1306-1315
- Millan MT, Shizuru JA, Hoffmann P, et al.** (2002) Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after hla-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation*, 73: 1386-1391
- Molpeceres J, Chacon M, Berges L, et al.** (1998) Age and sex dependent pharmacokinetics of cyclosporine in the rat after a single intravenous dose. *Int J Pharm*, 174: 9-18
- Molpeceres J, Chacon M, Guzman M, Aberturas MR, Berges L** (2000) Dependency of cyclosporine tissue distribution and metabolism on the age and gender of rats after single intravenous dose. *Int J Pharm*, 197: 129-141
- Morris R** (1994) Modes of action of FK506, Cyclosporin A, and Rapamycin. *Transplant Proc*, 26: 3272-3275
- Mueller EA, Kovarik JM, van Bree JB, et al.** (1994 a) Influence of a fat-rich meal on the pharmacokinetics of a new oral formulation of cyclosporine in a crossover comparison with the market formulation. *Pharm Res*, 11: 151-155
- Mueller EA, Kovarik JM, van Bree JB, et al.** (1994 b) Pharmacokinetics and tolerability of a microemulsion formulation of cyclosporine in renal allograft recipients – a concentration-controlled comparison with the commercial formulation. *Transplantation*, 57: 1178-1182
- Mueller EA, Kallay Z, Kovarik JM, Richard F, Wiesinger O, Schmidt K, Scheele J** (1995) Bile-independent absorption of cyclosporine from a microemulsion formulation in liver transplant patients. *Transplantation*, 60: 515-517
- Mueller EA, Kovarik JM, Uresin Y, et al.** (1997) Optimizing the absorption of valspodar, a P-glycoprotein modulator, Part I: Selecting an oral formulation and exploring its clinical pharmacokinetics/dynamics. *J Clin Pharmacol*, 37: 1001-1008
- Mutschler E** (2001) Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- Nadler JL, Yamamoto JV** (1986) Diurnal variation and exercise induced changes of prostacyclin in man. *Prostaglandins Leukot Med*, 22: 71-78



- Napoli KL, Wang ME, Stanislaw MS, Kahan BD** (1998) Relative tissue distributions of cyclosporine and sirolimus after concomitant peroral administration to the rat: evidence of pharmacokinetic interactions. *Ther Drug Monit*, 20: 123-133
- Nashan B, Cole E, Levy G, Thervet E** (2002) Clinical validation studies of Neoral C<sub>2</sub> monitoring: a review. *Transplantation*, 73: S3-11
- Nast CC, Cohen AH** (2001) Pathology of kidney transplantation. In Danovitch GM: Handbook of kidney transplantation, 3. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
- Neumayer HH, Färber L, Budde K, et al.** (1996) Long-term results of conversion from existing to microemulsion formulation of cyclosporine. *Transplant Proc*, 28: 2207-2213
- Neumayer HH** (2001) Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin. Uni-Med Verlag, Bremen
- Noble S, Markham A** (1995) Cyclosporine: a review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral®). *Drugs*, 50: 924-941
- Novartis Pharma** (2002) Fachinformation: Sandimmun® Optoral 10 mg, 25 mg, 50mg, 100 mg Kapseln
- Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B** (1995) Lake Louise Consensus Conference on cyclosporine monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit*, 17: 642-654
- Oellerich M, Armstrong VW** (1998) Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tacrolimus. Update on Lake Louise Consensus Conference on cyclosporine and tacrolimus. *Clin Biochem*, 31: 309-316
- Oellerich M, Armstrong VW** (2002) Two-hour cyclosporine concentration determination: an appropriate tool to monitor Neoral therapy? *Ther Drug Monit*, 24: 40-46
- Ogino Y, Kobayashi E, Fujimura A**, (1999) Comparison of cyclosporin A and tacrolimus concentrations in whole blood between jejunal and ileal transplanted rats. *J Pharm Pharmacol*, 51: 811-815
- Ogino Y, Kobayashi E, Kita J, Fujimura A, Kogure H** (1999) The site of absorption of cyclosporin A in the small intestine of the rat: a preliminary report. *Transplant Proc*, 31: 2659-2660
- Oka K, Hirano T, Shimodaira H, Homma M, Sakurai E, Tamaki T, Kozaki M** (1990) Suppression of endogenous cortisol for evaluating pharmacodynamics of prednisolone in early allograft rejection in renal transplantation. *Clin Chem*, 36: 481-486
- Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM** (1999) Immunosuppressant-induced nephropathy: pathophysiology, incidence and management. *Drug Saf*, 21: 471-488
- Opelz G, Wujciak T, Ritz E** (1998) Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int*, 53: 217-222
- Orijji GK** (2003) Role of metoprolol, B1-adrenoceptor antagonist, thromboxane A2 and nitric oxide in CsA-induced hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 68: 233-238
- Otto MG, Mayer AD, Clavien PA, et al.** (1998) Randomized trial of cyclosporine microemulsion (neoral) versus conventional cyclosporine in liver transplantation: MILTON study. *Transplantation*, 66: 1632-1640
- Palm S, Postler E, Hinrichsen H, et al.** (1996) Twenty-four-hour analysis of lymphocyte subpopulations and cytokines in healthy subjects. *Chronobiol Int*, 13: 423-434
- Parr MD, Barton SD, Haver VM, Porter WH** (1988) Cyclosporine binding to components in medication sets. *Drug Intell Clin Pharm*, 22: 173-174
- Patnaik RN, Lesko LJ, Chen ML, Williams RL** (1997) FDA Individual Working Group. Individual Bioequivalence: New concepts in the statistical assessment of bioequivalence metrics. *Clin Pharmacokinet*, 33: 1-6
- Pfeffer P, Stefoni S, Carreno C, et al.** (2002) Monitoring of 2-hour Neoral absorption in renal transplantation shows low incidence of acute rejection in the early post-graft period: interim results of the MO2ART study. American Society of Transplantation Congress, 16.04. – 01.05.2002, Washington DC., USA [Abstract 1037]
- Posener JA, Schildkraut JJ, Williams GH, Schatzberg AF** (1997) Cortisol feedback effects on plasma corticotropin levels in healthy subjects. *Psychoneuroendocrinology*, 22: 169-176
- Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Rosenthal JT, et al.** (1985) The effect of food on cyclosporine absorption. *Transplantation*, 40: 174-176

- Ptacheinski RJ, Logue LW, Burckart GJ, Venkataramanan R** (1986) Stability and availability of cyclosporine in 5% dextrose injection or 0,9% sodium chloride injection. *Am J Hosp Pharm*, 43: 94-97
- Ptacheinski RJ, Venkataramanan R, Burckart GJ, et al.** (1987) Cyclosporine kinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 27: 243-248
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al.** (1999) The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*, 55: 713-723
- Radeke HH, Christians U, Bleck JS, Sewing KF, Resch K** (1991) Additive and synergistic effects of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int*, 39: 1255-1266
- Radeke HH, Christians U, Sewing KF, Resch K** (1992) The synergistic immunosuppressive potential of cyclosporine metabolite combinations. *Int J Immunopharmacol*, 14: 595-604
- Rao A** (1995) NFATp, a cyclosporin-sensitive transcription factor implicated in cytokine gene induction. *J Leuk Biol*, 57: 536-542
- Rass H** (2001) Ökonomie in der Transplantationsmedizin. Wirksamkeit, Verträglichkeit und Wirtschaftlichkeit von Cicloral®. Beilage zur Zeitschrift Deutsche Medizinische Wochenschrift, 126. Jahrgang, Heft 51/52. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Reymond JP, Steimer JL, Niederberger W** (1988) On the dose dependency of cyclosporin A absorption and disposition in healthy volunteers. *J Pharmacokinet Biopharm*, 16: 331-353
- Richard WQ, Rippe A, Ma J, et al.** (1998) Nutritional status modulates rat liver cytochrome P450 arachidonic acid metabolism. *Mol Pharmacol*, 54: 504-513
- Ritschel WA** (1996) Microemulsion technology in the reformulation of cyclosporine: the reason behind the pharmacokinetic properties of Neoral. *Clin Transplant*, 10: 364-373
- Robert PY, Leconte V, Olive C, et al.** (2001) Cyclosporin A eyedrops: manufacturing, toxicity, pharmacokinetics and indications in 2000. *J Fr Ophtalmol*, 24: 527-535
- Rodicio JL** (2000) Calcium antagonists and renal protection from cyclosporine nephrotoxicity: long-term trial in renal transplant patients. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35 (3 suppl.): S7-11
- Rojanasakul Y, Wang LY, Bhat M, et al.** (1992) The transport barrier of epithelia: a comparative study on membrane permeability and charge selectivity in the rabbit. *Pharm Res*, 9: 1029-1034
- Roman ID, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Esteller E, Jimenez R** (1990) Inhibition of hepatocytary vesicular transport by cyclosporine A in the rat: relationship with cholestasis and hyperbilirubinemia. *Hepatology*, 12: 83-91
- Rosano TG, Freed BM, Cerilli J, Lempert N** (1986) Immunosuppressive metabolites of cyclosporine in the blood of renal allograft recipients. *Transplantation*, 42: 262-267
- Rosano TG, Pell MA, Freed BM, Dybas MT, Lempert N** (1988) Cyclosporine and metabolites in blood from renal allograft recipients with nephrotoxicity, rejection, or good renal function: comparative high-performance liquid chromatography and monoclonal radioimmuno-assay studies. *Transplant Proc*, 20: 330-338
- Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Luscher TF, Noll G** (2000) Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet*, 355: 548-549
- Sabatini S, Ferguson RM, Helderman HJ, et al.** (1999) Drug substitution in transplantation: A National Kidney Foundation white paper. *Am J Kidney Dis*, 33: 389-397
- Sadeg N, Pham-Huy C, Rucay P, Righenzi S, Halle-Panenko O, Claude JR, Bismuth H, Duc HT** (1993) In vitro and in vivo comparative studies on immunosuppressive properties of cyclosporines A, C, D and metabolites M1, M17 and M21. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 15: 163-177
- Salphati L, Benet LZ** (1998) Modulation of P-glycoprotein expression by cytochrome P450 3A inducers in male and female rat livers. *Biochem Pharmacol*, 55: 387-395
- Sanchez V, Lutz M** (1998) Dietary oils anti antioxidant vitamins supplementation affect the fatty acid composition of liver microsomal phospholipids in the rat. *J Nutr Biochem*, 9: 155-163
- Santos-Montes A, Gonzalo-Lumbreras R, Gasco-Lopez AI, Izquierdo-Hornillos R** (1994) Extraction and high-performance liquid chromatographic separation of deflazacort and its metabolite 21-hydroxydeflazacort application to urine samples. *J Chrom B*, 657: 248-253

- Santos-Montes A, Gonzalo-Lumbreras R, Izquierdo-Hornillos R** (1995) Simultaneous determination of cortisol and cortisone in urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Clinical and doping control applications. *J Chrom B*, 673: 27-33
- Sauer P, Klöters-Plachky P, Stiehl A** (1995) Inhibition of bile acid transport by cyclosporin A in rat. *Eur J Clin Invest*, 25: 677-682
- Savoldi S, Maiorca R, Maderna M, et al.** (1997) Low inpatient variability of blood cyclosporine levels is correlated with excellent graft survival. *Transplant Proc*, 29: 288-289
- Sawchuk RJ, Awni WM** (1986) Absorption of cyclosporine from rabbit small intestine in situ. *J Pharm Sci*, 75: 1151-1156
- Sayegh Mh, Turka LA** (1998) The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med*, 338: 1813-1821
- Sayegh MH** (1999) Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int*, 56: 1967-1979
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L** (1996) P-glycoprotein in the blood-brain-barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest*, 97: 2517-2524
- Schirmeister J, Willmann H, Kiefer H, Hallauer W** (1964) *Dtsch med Wschr*, 89: 1640
- Schroeder TJ, Cho MJ, Pollack GM, et al.** (1998) Comparison of two cyclosporine formulations in healthy volunteers: bioequivalence of the new Sang-35 formulation and Neoral. *J Clin Pharmacol*, 38: 807-814
- Schütz E, Svinarov D, Shipkova N et al.** (1998) Cyclosporine whole blood immunoassays (AxSYM, CEDIA, and Emit): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. *Clin Chem*, 44: 2158-2164
- Seelig A, Landwojtowicz E** (2000) Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur J Pharm Sci*, 12: 31-40
- Shah MB, Martin JE, Schroeder TJ, et al.** (1999) The evaluation of the safety and tolerability of two formulations of cyclosporine: neoral and sandimmune. A meta-analysis. *Transplantation*, 67: 1411-1417
- Sheppard KE** (1995) Cyclosporin A and FK506 are potent activators of proopiomelanocortin-derived peptide secretion without affecting corticotrope glucocorticoid receptor function. *J Neuroendocrinol*, 7: 833-840
- Shibata N, Ohmae T, Hoshino N, Minouchi T, Yamaji A** (1999) Influence of glycerol-induced acute renal failure on the pharmacokinetics of cyclosporin in rats. *J Pharm Pharmacol*, 51: 397-404
- Sigalet DL, Kneteman NM, Thomson AB** (1992) Reduction of nutrient absorption in normal rats by cyclosporine. *Transplantation*, 53: 1103-1107
- Sindhi R, LaVia MF, Paulling E, et al.** (2000) Stimulated response of peripheral lymphocytes may distinguish cyclosporine effect in renal transplant recipients receiving a cyclosporine + rapamycin regimen. *Transplantation*, 69: 432-436
- Steimer W** (1999) Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporine monitoring: how specific is specific? *Clin Chem*, 45: 371-381
- Steinijans VW, Hauschke D** (1993) International harmonization of regulatory bioequivalence requirements. *Clin Research & Reg Affairs*, 10: 203-220
- Stemmer P, Klee CB** (1991) Serine/threonine phosphatases in the nervous system. *Curr Opinion Neurobiol*, 1: 53-64
- Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, et al.** (2001) Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 12: 1359-1368
- Svec F, Shawar AL** (1997) The acute effect of a nonntime meal on the serum levels of cortisol and DHEA in lean and obese women. *Psychoendocrinology*, 22: S115-119
- Taesche S, Neise D** (1994) Safety and tolerability of a new oral formulation of cyclosporine A, Sandimmun Neoral (Novartis), in renal transplant patients. *Transpl Int*, 7 (1 suppl.): S263-266
- Takami H, Backer CL, Crawford SE, Zales VR, Mavroudis C** (1995) Influence of gender on allograft rejection in a rat heart transplant model. *J Heart Lung Transplant*, 14: 529-536

- Tarr BD, Yalkowski SH** (1989) Enhanced intestinal absorption of cyclosporine in rats through the reduction of emulsion droplet size. *Pharm Res*, 6: 40-43
- Textor SC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wilson DJ, Schwartz LL, et al.** (1994) Cyclosporine-induced hypertension after transplantation. *Mayo Clin Proc*, 69: 1182-1193
- Textor SC, Burnett JC, Romero JC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wiesner R, Porayko M, Krom R, Gores G, Hay E** (1995) Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int*, 47: 1426-1433
- Thomas H, Coley HM** (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*, 10: 159-165
- Thomas K** (2002) Three generations of cyclosporine A formulations – an in vitro comparison. Diplomarbeit aus dem Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Thomas L** (1992) Labor und Diagnose, 4. Aufl., Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg
- Tijja JF, Webber IR, Back DJ** (1991) Cyclosporin metabolism by the gastrointestinal mucosa. *Br J Clin Pharmacol*, 31: 344-346
- Tredger JM, Naoumov NV, Steward CM** (1988) Influence of biliary T-tube clamping on cyclosporine pharmacokinetics in liver transplant recipients. *Transplant Proc*, 20: 512-515
- Tsunoda SM, Harris RZ, Christians U, Velez RL, Freeman RB, Benet LZ, Warshaw A** (2001) Red wine decreases cyclosporine bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*, 70: 462-467
- Tumlin JA**, (1997) Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling and ion transport. *Am J Kidney Dis*, 30: 884-895
- Van Buren DH, Burke JF, Lewis RM** (1994) Renal function in patients receiving long-term cyclosporine therapy. *J Am Soc Nephrol*, 4(8 suppl.): S17-22
- Vedhara K, Miles J, Bennett P, Plummer S, Tallon D, Brooks E, Gale L, Munnoch K, Schreiber-Kounine C, Fowler C, Lightman S, Sammon A, Rayter Z, Farndon J** (2003) An investigation into the relationship between salivary cortisol, stress, anxiety and depression. *Biol Psychol*, 62: 89-96
- Venkataramanan R, Perez HD, Schwinghammer T** (1986) Effect of bile on cyclosporine absorption in dogs. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 53: 137-140
- Venkatraman JT, Feng X, Pendergast D** (2001) Effects of dietary fat and endurance exercise on plasma cortisol, prostaglandin E2, interferon-gamma and lipid peroxides in runners. *J Am Coll Nutr*, 20: 529-536
- Vine DF, Charman SA, Gibson PR, Sinclair AJ, Porter CJ** (2002) Effect of dietary fatty acids on the intestinal permeability of marker drug compounds in excised rat jejunum. *J Pharm Pharmacol*, 54: 809-819
- Vonderscher J, Meinzer A** (1994) Rationale for the development of Sandimmune Neoral. *Transplant Proc*, 26: 2925-2927
- Waxman DJ, Ram PA, Pampori NA, Shapiro BH** (1995) Growth hormone regulation of male-specific rat liver P450s 2A2 and 3A2: induction by intermittent growth hormone pulses in male but not female rats rendered growth hormone deficient by neonatal monosodium glutamate. *Mol Pharmacol*, 48: 790-797
- Wenger R** (1986) Cyclosporine and analogues: structural requirements for immunosuppressive activity. *Transplant Proc*, 6: S213-218
- Wenger R** (1990) Structures of cyclosporine and its metabolites. *Transplant Proc*, 22: 1104-1108
- Whittington PF, Emond JC, Whittington SH, Broelsch CE, Baker AL** (1990) Small-bowel length and the dose of cyclosporine in children after liver transplantation. *New Engl J Med*, 322: 733-738
- Wilson TH, Wiseman G** (1954) The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol*, 123: 116-125
- Wood CE** (1986) ACTH, cortisol, and renin responses to arterial hypotension in sheep. *Am J Physiol*, 251: R18-22
- Wu C, Benet LZ, Hebert MF, et al.** (1995) Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: studies with cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*, 58: 492-497
- Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Takatuki M** (2001) Effects of olive, corn, sesame or peanut oil on the body weights and reproductive organ weights of immature male and female rats. *Exp Anim*, 50: 173-177

**Zeier M, Mandelbaum A, Ritz E** (1998) Hypertension in transplanted patients. *Nephron*, 80: 257-268